Regulation der Initiation der DNA-Synthese bei *Escherichia coli*

Das Initiations - RNA - Operon und seine Kontrolle

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ruth Tippe - Schindler
aus Zürich

Berlin 1974

Regulation der Initiation der DNA-Synthese bei *Escherichia coli*

Das Initiations - RNA - Operon und seine Kontrolle

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ruth Tippe - Schindler
aus Zürich

Berlin 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Gutachter: Prof. Dr. T. A. Trautner

2. Gutachter: Prof. Dr. E.-R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 1974

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Zusammenfassung		1
1. Einleitung		2
2. Material und Methoden		7
2.1	Bakterienstämme	7
2.2	Medien und Antibiotika	8
2.3	Messung von DNA, Protein und Zellzahl	9
2.4	Dichtemarkierung und isopyknische Zentrifugation	9
2.5	Genetische Techniken	10
3. Resultate		12
3.1	Charakterisierung der Initiationsmutanten	12
3.1.1	DNA-Synthese bei 42°	12
3.1.2	Zellteilung bei 42°	15
3.1.3	Der Initiationsort nach Inkubation bei 42°	17
3.1.4	Charakterisierung der anderen Initiationsmutanten	23
3.2	Reversibilität der Inaktivierung	25
3.2.1	Initiation in Gegenwart von Chloramphenicol nach Renaturierung des dnaA-Produktes	25

Seite

3.2.2 Initiation in Gegenwart von Rifampin nach Renaturierung des dnaA-Produktes 28

3.2.3 Replikation nach Renaturierung des dnaA-Produktes in Gegenwart von Rifampin oder Chloramphenicol 31

3.2.3.1 Zellteilung nach Initiation durch Renaturierung des dnaA-Produktes 31

3.2.3.2 Sequentielle Replikation nach Renaturierung des dnaA-Produktes 35

3.2.4 Renaturierungsversuche mit anderen Initiationsmutanten 38

3.3 Funktion des dnaA-Produktes 44

3.3.1 Stimulierung der Initiation durch Hemmung der Proteinsynthese 44

3.3.1.1 Chloramphenicol in exponentiell wachsenden Zellen 44

3.3.1.2 Rifampin in exponentiell wachsenden Zellen 49

3.3.1.3 Einfluß der Hemmung der Proteinsynthese auf die Initiation bei anderen Initiationsmutanten 51

3.3.2 Verzögerung der Initiation 54

3.3.2.1 Verzögerung der Initiation bei 33° 54

3.3.2.2 Verzögerung der Initiation bei verschiedenen Temperaturen 60

Seite

3.3.3 Temperaturabhängigkeit der Stimulierung und der Verzögerung der Initiation 64

3.3.3.1 DNA-Synthese nach Temperaturshift 66

3.3.3.2 Stimulierung der Initiation durch CAM nach verschiedenen Vorinkubationstemperaturen 69

3.3.3.3 Anteil stimulierbarer Chromosomen 71

3.3.4 Initiationspotential 76

3.4 Genetische Daten

3.4.1 Dominanz von dnaA

3.4.2 Transdominanz von dnaA 5

4. Diskussion 84

4.1 Wirkungsort des dnaA und dnaC Produktes 84

4.2 Negative Kontrolle der Initiation 87

4.3 Zeitliche Kontrolle der Initiation 92

5. Literaturverzeichnis 96

Abkürzungen

Zusammenfassung

Anhand von Experimenten mit dnaA- und dnaC-Mutanten wurde versucht, einzelne Schritte der Initiation der DNA-Synthese zu unterscheiden. Der Einfluß dieser Genprodukte auf die Synthese von Initiations-RNA wurde untersucht. Es zeigte sich, daß diese Synthese unabhängig vom dnaC-Produkt ist, aber weitgehend abhängig von dnaA.

Bei dnaA-Mutanten kann durch Hemmung der Proteinsynthese in exponentiell wachsende Zellen die Initiationsfrequenz kurzzeitig stimuliert werden. Diese Stimulierung ist abhängig von der vorhergehenden Anhäufung an Initiationsproteinen und Initiations-RNA und beruht auf dem Zerfall eines negativen Kontrollelementes der Initiation. Dieses wird während des ganzen Zellzyklus synthetisiert und unterliegt einem hohen turnover. Durch Stop der Proteinsynthese ist die Neusynthese des Kontrollelementes unterbunden, nicht jedoch seine kontinuierliche Inaktivierung. Schon vorbereitete Initiationen können damit vorzeitig eintreten. Das dnaA-Produkt ist an der negativen Kontrolle beteiligt, ist möglicherweise das negative Kontrollelement selbst.

Es wird ein Modell vorgeschlagen, demzufolge dieses negative Kontrollelement einen Repressor darstellt, der die Synthese der Initiations-RNA in einem Initiations-RNA-Operon reguliert.

1 Einleitung

Die Initiation der DNA-Synthese ist das wichtigste Regulationsereignis im Zellzyklus von Escherichia coli. Die Zellteilung ist fest an den Ablauf der DNA-Synthese gekoppelt. Sie erfolgt erst, wenn jede sich teilende Zelle zwei fertig replizierte Chromosomen enthält. Es besteht damit eine feste Abhängigkeit der Teilung von der Initiation der DNA-Synthese. Damit ist die Generationszeit durch die Initiationsfrequenz reguliert (Helmstetter, Cooper, Pierucci and Revelas, 1968).

Die Initiation der Replikation umfasst die Vorbereitung des Chromosoms und die Vorgänge bis zum Beginn der DNA-Synthese. Diese beginnt immer an der gleichen Stelle des Chromosoms, am "origin" (Wolf, Newman, and Glaser, 1968; Bird, Louarn, Martuscelli, and Caro, 1972). Auf die Initiation folgt die bidirektionale Replikation des Chromosoms, d. h. vom "origin" wird in beide Richtungen synthetisiert (Masters and Broda, 1971). Die Rate, mit der begonnene DNA-Moleküle polymerisiert werden, ist konstant und - mit gewissen Einschränkungen - unabhängig von der Wachstumsrate. So dauert es bei E. coli B/r bei 37° 40 Minuten, um ein Chromosom zu replizieren (Helmstetter and Cooper, 1968). Die Anpassung an unterschiedliche Wachstumsraten wird durch Änderung der Häufigkeit, mit der Chromosomen neu initiiert werden, erreicht (Helmstetter and Cooper, 1968). Wenn

die Replikationspunkte das Ende der Chromosomenrunde erreichen, wird die Teilung induziert, die nach weiteren 20 Minuten erfolgt (Helmstetter and Pierucci, 1968).

Mehrere Genorte mit temperatursensitiven Mutanten sind bekannt, die die DNA-Synthese betreffen. Solche Mutanten sind unterteilbar in Elongationsmutanten (dnaB, dnaE und dnaG) bei denen die Polymerisation von Triphosphaten zu hochmolekularer DNA bei nichtpermessiver Temperatur blockiert ist (siehe Gross, 1972 für eine Übersicht über die relevante Literatur) und in Initiationsmutanten, bei denen die Chromosomen bei nichtpermissiver Temperatur zu Ende replizieren können, doch Neuinitiationen nicht stattfinden. Folgende Genorte sind bekannt, die die Initiation der DNA-Synthese betreffen: dnaA (Hirota, Ryter, and Jacob,1968; Shapiro, Siccardi, Hirota, and Jacob 1970; Carl, 1970; Abe und Tomizawa, 1971), dnaC (Carl, 1970; Wilf, 1972; Schubach, Whitmer, and Davern, 1973), dnaH (Sakai, Hashimoto, and Komano, 1974) und dnaI (Beyersmann, Messer and Schlicht, 1974).

Die Initiation der DNA-Synthese ist abhängig von Proteinsynthese (Maaløe und Hanawalt, 1961). Wird diese durch Zugabe von Chloramphenicol oder durch Entzug einer essentiellen Aminosäure blockiert, so stoppt die Initiation nach ca. 5 Minuten (Ward und Glaser, 1969; Messer, 1972). Die Replikation der angefangenen Chromosomen geht weiter, bis diese fast zu Ende repliziert sind (Marunouchi und Messer, 1973). Die Empfindlichkeit der Initiation gegen Stop der Proteinsynthese und die Kenntnis verschiedener Genorte, läßt darauf schließen, daß die Initiation der DNA-Synthese von mehreren spezifischen Proteinen abhängig ist. Da die Initiation sehr schnell nach Hemmung der Proteinsynthese stoppt, kann angenommen werden, daß Initiationsproteine bis kurz vor dem Initiationsereignis synthetisiert werden müssen.

Die Initiation der DNA-Synthese ist außerdem abhängig von RNA-Synthese (Lark, 1972; Messer, 1972). Rifampin, ein Inhibitor der Initiation der RNA-Synthese, blockiert die Initiation der DNA-Synthese ohne nachweisbare Verzögerung. Diese Beobachtungen führten zu dem Konzept, daß die Initiation der Replikation mit RNA-Synthese beginnt und diese RNA als Primer für nachfolgende DNA-Synthese dient. Bei verschiedenen Phagen (Wickner, Brutlag, Schekman, and Kornberg, 1972; Keller, 1972; Hayes and Szybalski, 1973; Speyer, Chao, and Chao, 1972) wurde RNA kovalent an DNA gebunden gefunden. Ein entsprechendes RNA-Stück ist bei der Initiation der DNA-Synthese bei E. coli beteiligt (Messer und Tippe-Schindler, 1974).

Die Initiation der Replikation ist nicht nur wegen ihrer zentralen Bedeutung im Zellzyklus eines Bakteriums von Interesse. Die Regulation eines derartigen zyklischen Vorganges könnte durch bisher unbekannte Kontrollmechanismen erfolgen und ein Modell für verschiedene ähnliche Vorgänge in anderen Organismen sein. Obwohl verschiedene Hypothesen zu dieser Regulation aufgestellt wurden, gibt es wenige experimentelle Daten und die Frage nach der materiellen Basis der "Uhr" des Bakteriums ist noch immer ungeklärt.

Der erste Versuch einer Erklärung der Regulation der Initiation war das Replikon-Modell von Jacob, Brenner und Cuzin (1963). Es sagt aus, daß auf dem Chromosom eine spezifische Stelle, ein Replikator,

vorhanden ist, auf den ein oder mehrere Proteine, die Initiatoren, einwirken. Diese sind spezifisch für den betreffenden Replikator. Die gesamte, autonom replizierende Einheit ist ein Replikator. Die Synthese von Initiator und damit der Zeitpunkt der Initiation sollte an den Replikationszyklus gekoppelt sein durch die Lage des Initiatorgens auf dem Chromosom. Die Beobachtung, daß Initiation unabhängig von Replikation erfolgen kann (Pritchard and Lark, 1964), machte dieses Modell unwahrscheinlich.

In einem anderen Modell positiver Kontrolle (Maaløe and Kjeldgaard, 1966) sollen Initiationsproteine angehäuft werden. Initiation erfolgt dann, wenn ein bestimmter Schwellenwert an Initiationsprotein erreicht ist.

Modelle für negative Kontrolle wurden von Pritchard, Barth und Collins (1969) und von Rosenberg, Cavalieri und Ungers (1969) postuliert. Danach sollen kurz nach einer erfolgten Initiation Inhibitor-Moleküle synthetisiert werden, die die nachfolgende Initiation verhindern. Durch Größenzunahme der Zelle sinkt die Konzentration an Inhibitor, bis die nächste Initiation stattfinden kann. Ein ähnliches Modell haben Sompayrac und Maaløe (1973) vorgeschlagen, bei dem die Synthese von Initiationsproteinen durch ein Autorepressor-System kontrolliert wird.

In einem weiteren Typ an Modellen für die Regulation der Initiation wird durch spezifisches Wachstum der Membran die neue Initiation ermöglicht und damit kontrolliert (Marvin, 1968; Helmstetter, 1974).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Genprodukte von dnaA und dnaC auf die Synthese der Initiations-RNA und den Beginn der DNA-Synthese analysiert. Es wurde gezeigt, daß ein negatives Kontrollelement bei der Regulation der Initiation beteiligt ist. Die Resultate führten dazu, ein Operon zu postulieren (siehe Figur 26), das für die Synthese von Initiations-RNA verantwortlich ist und negativ kontrolliert wird. Dabei dient das dnaA-Produkt vermutlich als Repressor. Seine Menge wird durch konstante Syntheserate und raschen Zerfall konstant gehalten. Neben dieser negativ kontrollierten Synthese der Initiations-RNA muß eine - möglicherweise positiv - kontrollierte Synthese von Initiationsproteinen gefordert werden, zusätzlich zum dnaA-Produkt.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme*

E. coli WM 301:	B/r, F^-, *leu*, *pro*, *lac*, *gal*, *try*, *his*, *arg*, *thy*, *strA*, *met*, *drm*, *hss* - K12. Abkömmling von HB 50 von H. Boyer.
E. coli WM 301 *dnaA* 5:	neben den Markern von WM 301 trägt dieser Stamm das *dnaA* 5 Allel von *E. coli* K12 PC5 (P. Carl, 1970), durch P1-Cotransduktion mit *ilv* übertragen.
E. coli WM 301 *dnaA* 46:	*dnaA* 46 wurde von *E. coli* K12 CRT 4634 (Y. Hirota et al., 1968) durch P1-Cotransduktion mit *ilv* in Stamm WM 301 eingeführt.
E. coli WM 301 *dnaA* 203:	
dnaA 204:	
dnaA 205:	Diese Stämme wurden durch Mutagenese von
dnaA 211:	WM 301 abgeleitet.
dnaC 201:	(Beyersmann et al., 1974)
dnaC 215:	
dnaI 208:	
E. coli AB 2279:	K12, F^-, *pro*, *lac y* od *z*, *his*, *met*, *ile*, *val*, *ara*, *gal*, *try*, *mal*, *thi A*, *mtl*, *tsx*, *tonA*.

*Genetic Nomenklatur nach Demerec et al. (1966).

E. coli 33/JC 1553: (CGSC* No. 4265)
K12, F'133, argG6, gal-6, his-1, lacY1 od. lacZ4, leu-6, malA1, metB1, mtl-2, recA1, rel-1?, str-104, sup-48?, xyl-7, λ^R.

E. coli KLF 41: K12, leu-2, his-1, met-1, argG-6, strA, λ^-, lac_Δ, recA, su_{II}^+, xyl, man, malA.

2.2 Medien und Antibiotika

a) Minimalmedien: 008 (Helmstetter, 1967) enthält 2 g NH_4Cl, 6 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$, 3 g KH_2PO_4, 3 g NaCl, 0,175 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ pro Liter demineralisiertes Wasser.
M9-Agar für Platten besteht aus 14,6 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$, 6 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 2 g NH_4Cl; 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$; 1,5 % Difco Bacto Agar pro Liter demineralisiertes Wasser.
Zugesetzt wurde bei beiden Medien 0,2 % Glucose, die benötigten Aminosäuren und Thymin, je 20 µg/ml. In Experimenten, in denen Proteinsynthese durch Aminosäurehunger blockiert wurde, wurde von den benötigten Aminosäuren nur Methionin und Histidin zugegeben.
b) Vollmedien: TY enthält 10 g Trypton, 5 g Yeast Extrakt (beides von Difco) und 0,5 % NaCl. NB ist Difco Nutrient Broth ohne NaCl.
c) Antibiotika: Rifampin B-grade, Calbiochem, San Diego, Calif., USA; Chloramphenicol, Sigma, St. Louis, Mo. USA; Nalidixinsäure, Winthrop Laboratories, New Castle Upon Tyne, Great Britain.

---

*CGSC Coli Genetic Stock Center

2.3 Messung von DNA, Protein und Zellzahl

a) Als Dauermarkierung der DNA wurde ^{3}H-Thymin (Amersham, England) (12,6 mCi/mmol, 2 µCi/ml) oder ^{14}C Thymin (Amersham, 12 - 16 mCi/mmol, 2 µCi/ml) angeboten. Die Zellen wuchsen mindestens fünf Generationen vor Beginn der Experimente im radioaktiven Medium, um die DNA gleichmäßig zu markieren. Der Einbau von radioaktivem Thymin in säurefällbares Material wurde nach Zugabe von TCA (5 % mit 100 µg Thymin/ml Endkonzentration) bestimmt.

b) Die Rate der DNA-Synthese wurde mit Pulsen von ^{3}H-Thymidin (Amersham, 2 Ci/mmol, 0,5 µCi/ml Endkonzentration) gemessen. Je 0,5 ml Kultur wurden mit 0,5 ml radioaktivem Medium 4 min inkubiert. Die Synthese wurde durch Zugabe von TCA (5 % mit 100 µg/ml Thymidin) gestoppt.

c) Für Dauermarkierung von Protein wurde ^{3}H- oder ^{14}C-Leucin (Amersham; 0,65 mCi/mmol, 0,1 µCi/ml) verwendet. Vor Beginn des Experimentes waren die Bakterien jeweils mehrere Generationen im Medium mit radioaktivem Leucin gewachsen.

d) Die Zellzahl und die Zellgröße wurde mit einem Coulter Counter gemessen, der mit einem Nuclear Data Vielkanal-Analysator verbunden ist.

2.4 Dichtemarkierung und isopyknische Zentrifugation

Bei Dichteshift-Experimenten wurde ^{14}C Thymin (Amersham, 12 - 16 mCi/mmol) als Dauermarkierung der DNA und ^{3}H-Thymidin als Pulsmarkierung (20 Ci/mmol, 1 µCi/ml) angeboten, entsprechend den Protokollen im Teil Resultate.

Zum Wechsel von Medien (Shifts von leichtem in schweres Medium) wurden die Zellen rasch über Millipore Filter (Porendurchmesser 0,45 µ) filtriert. Im "schweren" Medium ist $^{14}NH_4Cl$ ersetzt durch $^{15}NH_4Cl$ (2 µg/ml; 95 Atom % ^{15}N; Bio Rad, Richmond, Calif.) und ^{12}C-Glukose durch ^{13}C-Glukose (2 µg/ml; 50 Atom % ^{13}C, Merck, Sharp and Dohme, Montreal). Der Einbau wurde gestoppt durch schnelles Abkühlen der Proben auf 0° C. Die Bakterien wurden dann durch Abzentrifugieren dreimal mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8 gewaschen, um nicht eingebaute Radioaktivität zu entfernen. Die Zellen wurden lysiert mit Lysozym (Boehringer, Mannheim) 4 mg/ml und EDTA 15 mmol pH 8,5 während 10 min bei Zimmertemperatur. Dann wurde SDS auf 1 % zugegeben. Die DNA wurde geschert durch kurzes (3 sec) heftiges Mischen auf dem Whirl Mix (Cenco, Breda, Holland).

Für jeden Gradienten wurden 3,8 g CsCl in 3,0 g Bakterienlysat gelöst. Zentrifugiert wurde 60 Stunden bei 15° C mit 30.000 Upm (R50 Ti-Rotor, Spinco Model L265B). Fraktionen zu je ca. 0,1 ml wurden vom Boden der Gradienten ausgetropft, mit je 5 ml Instagel (Packard Instrument Corp., Downers Grove, Ill., USA) und 10 % Wasser versetzt und im Szintillationszähler (Nuclear Chicago, Isocap 300) gezählt.

2.5 Genetische Techniken

Temperatursensitivität von Mutanten wurde auf NB-Platten getestet. Kolonien, die nach Ausstreichen oder Stempeln auf NB 30° und 42° nicht

oder deutlich schlechter wuchsen als bei 30°, wurden als temperatursensitiv klassifiziert.

P1 Transduktionen wurden durchgeführt wie bei Wolf et al. (1968) beschrieben: Die Bakterien wurden in TY-Medium angezogen bis zu einem Titer von 5×10^8. Nach Abzentrifugieren wurden die Zellen in halbem Volumen Adsorptionsmedium (10^{-2} M $MgSO_4$, $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ M $CaCl_2$) resuspendiert. Zur Adsorption der P1-Phagen wurde je 1 ml Bakterien (1×10^9/ml) mit 2 ml P1-Phagen (1×10^8 /ml) 30 min bei 30° oder 20 min bei 37° inkubiert. Das Gemisch wurde auf selektives Medium ausplattiert.

Kreuzungen mit F' Stämmen als Donatoren wurden folgendermaßen durchgeführt: Der Donor wuchs bei 37°, der Rezipient bei 30° bis zu einem Titer von ca. 2×10^8. Gleiche Volumina Donor und Rezipient wurden gemischt und eine Stunde bei 37° inkubiert. Die Konjuganten wurden auf selektives Medium ausplattiert, das nur das Wachstum von Rekombinanten erlaubt.

3 Resultate

3.1 Charakterisierung der Initiationsmutanten

3.1.1 DNA-Synthese bei 42°

Der Stamm E. coli WM 301 dnaA 5 ist temperatursensitiv in der Initiation der DNA-Synthese durch die Mutation dnaA, die von E. coli K12 PC 5 (Carl, 1970) auf WM 301 übertragen wurde.

Um die DNA-Synthese bei 42° zu bestimmen, wurde eine ^{3}H-Thymin markierte, exponentiell bei 33° wachsende Kultur auf 42° geshiftet und der Einbau von ^{3}H-Thymin in DNA gemessen (Fig. 1 A). Die DNA-Synthese hört bei 42° nach 20 - 30 min auf, die Kurve erreicht ein Plateau. Die Menge an DNA, die bei 42° noch synthetisiert werden kann, entspricht einer Zunahme um 40 %. Proteinsynthese wurde durch Einbau von ^{14}C-Leucin gemessen. Der Einbau bei 42° ist fast identisch mit der Kontrolle bei 33°. Die Proteinsynthese ist also von der Mutation nicht betroffen.

In einer exponentiell wachsenden Kultur, deren Initiation gestoppt ist, erwartet man eine restliche DNA-Synthese von 39 %, vorausgesetzt, daß die DNA kontinuierlich und mit einem Replikationspunkt pro Chromosom repliziert (Maaløe und Hanawalt, 1961; Sueoka und Yoshikawa, 1965). Diese restliche Synthese, die dem Zuendereplizieren der Chromosomen entspricht, wird im folgenden "Restsynthese" genannt.

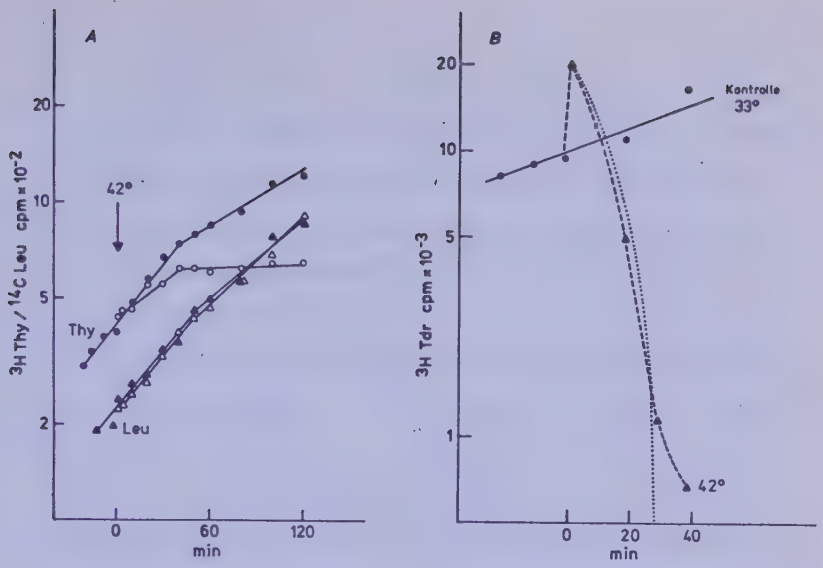


Abbildung 1: DNA- und Proteinsynthese von WM 301 dnaA 5 bei 42°

A) Eine ^{3}H-Thymin und ^{14}C-Leucin markierte Kultur wurde bei einem Titer von 1,5 x 10^8 auf 42° geshiftet (siehe Pfeil). Menge der DNA-Synthese (^{3}H-Thymin) bei 33° (●), bei 42° (o), Menge der Proteinsynthese (^{14}C-Leucin) bei 33° (▲), bei 42° (△).

B) Rate der DNA-Synthese bei 42°, nach shift bei einem Titer von 5 x 10^7. Rate der DNA-Synthese (^{3}H-Thymidin) bei 30° (o), bei 42° (o). (.....) Theoretische Kurve, für die Rate der DNA-Synthese nach Blockieren der Initiation. Es wird dabei angenommen, daß die Replikationspunkte bei 42° in doppelter Geschwindigkeit synthetisieren. Die Kurve gibt die Zahl der Replikationspunkte an, die zu jeder Zeit synthetisieren, also noch nicht das Ende des Chromosoms erreicht haben, und wird erhalten aus der Integration der Altersverteilung (Sueoka und Yoshikawa, 1965):

$$N = \ln 2 \int_x^1 2^{1-x}\, dx = 2^{1-x} - 1$$

x = Position des Replikationspunktes, relativ zur Gesamtlänge des Chromosoms (= 1).

Die Rate der DNA-Synthese wurde durch Pulse mit ^{3}H-Thymidin bestimmt (siehe Material und Methoden). Nach einem shift auf 42° steigt die Rate der DNA-Synthese zunächst über die Kontrollrate bei 33° an (Fig. 1B). Danach erfolgt ein rascher Abfall der Syntheserate. Nach 30 min bei 42° ist die DNA-Syntheserate auf 10 % abgefallen. Der anfängliche Anstieg beruht auf einer Erhöhung der Replikationsgeschwindigkeit individueller Wachstumspunkte infolge der Temperaturerhöhung. Diese wird auch beim Wildtyp nach shift auf 42° beobachtet. Der Verlauf der Rate bei 42° kann mit einer theoretischen Kurve verglichen werden, die unter der Annahme berechnet wurde, daß Replikationspunkte bis zum Ende des Chromosoms replizieren, aber keine neuen Wachstumspunkte initiiert werden (Fig. 1 B). Die theoretische und die experimentell ermittelte Kurve sind fast identisch unter der Annahme, daß die Replikationspunkte bei 42°, im Vergleich zu 33°, mit doppelter Geschwindigkeit synthetisieren.

Die Menge DNA, die bei 42° noch synthetisiert werden kann und die Kinetik, mit der die Synthese bei 42° aufhört, entspricht direkt den Erwartungen für eine Initiationsmutante. Diese Ergebnisse liefern jedoch keinen eindeutigen Beweis; denn die Replikationspunkte könnten bei 42° nach einiger Zeit die Synthese an zufällig verteilten Stellen auf dem Chromosom abbrechen.

Um die Mutante eindeutig als Initiationsmutante zu charakterisieren, wurde der Anstieg des Zelltiters bei 42° gemessen und ein Dichteshift-Experiment durchgeführt.

3.1.2 Zellteilungen bei 42°

Zellteilungen sind in der Weise von der Initiation der DNA-Synthese abhängig, daß nur Zellen mit zwei vollständig replizierten Chromosomen sich teilen können (Clark und Maaløø, 1967). Bei einer Initiations-Mutante wird erwartet, daß jedes initiierte Chromosom bei 42° fertig repliziert wird und eine Teilung folgt (Beyersmann et al., 1971).

Eine exponentiell bei 33° wachsende Kultur wurde auf 42° geshiftet, und die Zellzahl gemessen (Fig. 2). Während der ersten ca. 60 min steigt der Titer fast wie in der Kontrollkultur an. Dann wird langsam ein Plateau erreicht. Die Zunahme an Zellen bei 42° entspricht dem 2,3-fachen des Ausgangstiters. Nach Erreichen des Plateaus nimmt das Volumen der Zellen zu, da die Proteinsynthese ungehindert weiterläuft.

Bei einer Generationszeit von 55 min, wie sie für die Mutante dnaA 5 bei 33° gemessen wird, ist ein Replikationspunkt pro Chromosom vorhanden. 25 - 30 % der Zellen sind in der D-Phase (Helmstetter et al., 1968; Marunouchi und Messer, 1973 a), d. h. zwischen Ende der Replikation eines Chromosoms und Zellteilung. Diese Zellen haben damit zwei Chromosomen, die bereits neu initiiert sind. Setzen wir zum Zeitpunkt des shifts auf 42° die Zellzahl = 1, dann erreicht diese nach Teilung der in der D-Phase befindlichen Zellen den Faktor 1,28.*

---

*Aus der Altersverteilung von Powell (1956) folgt:

$$F = \ln 2 \int_{0}^{x} 2^{(1-x)}\,dx + 2 \cdot \ln 2 \int_{x}^{1} 2^{(1-x)}\,dx = 2^{(1-x)}$$

Dabei ist der gesamte Zellzyklus = 1 gesetzt und x ist das Zellalter (relativ zum Gesamtzyklus) zur Zeit der Termination der Replikation. Für dnaA 5 bei 33° ist x = 0,64, also F = 1,28.

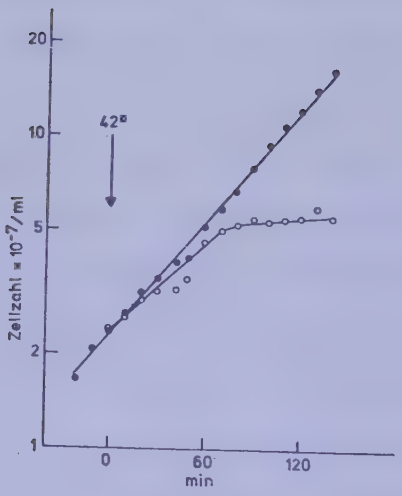


Abbildung 2: Zellteilungen bei 42° von WM 301 dnaA 5

Die Kultur wurde bei Titer 2,5 x 10^7 auf 42° geshiftet (siehe Pfeil) Zellzahl bei 30° (●), bei 42° (o).

Nun haben alle diese Zellen je ein initiiertes Chromosom, das zu einer weiteren Zellteilung führt. Dies ergibt dann eine Zunahme auf das 2,56-fache des Ausgangstiters. Bei WM 301 dnaA 5 wird ein Faktor von ca. 2,3 erreicht, also fast der theoretisch erwartete Wert. Dieses Ergebnis unterstützt das Postulat, daß die Mutante WM 301 dnaA 5 eine Initiationsmutante ist. Denn falls die Replikationspunkte nach dem shift auf 42° nur noch einen Chromosomenabschnitt unbestimmter Länge synthetisieren und an zufälligen Stellen des Chromosoms abbrechen würden, so könnte auf eine solche Synthese keine Zellteilung folgen. Der Faktor an restlichen Zellteilungen würde wesentlich tiefer liegen.

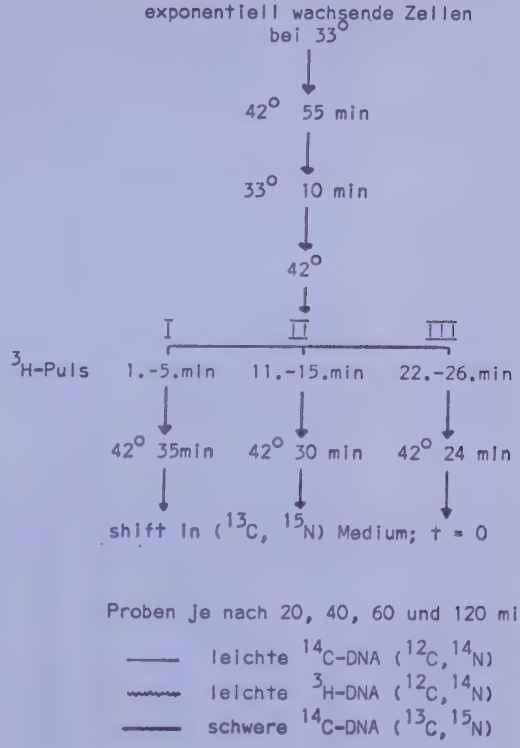
3.1.3 Der Initiationsort nach Inkubation bei 42°

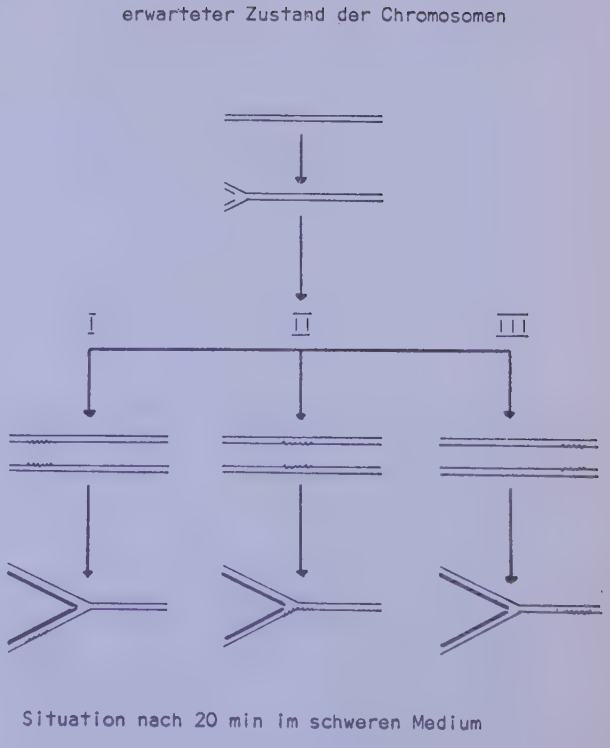
Eine Kultur, die für einige Zeit (z. B. 40 min) bei 42° inkubiert wurde, und wieder auf 33° zurückgeshiftet wird, startet sofort mit neuer DNA-Synthese.

Mit Hilfe eines Dichteshift-Experimentes soll nachgewiesen werden, daß Anfangs- und Endpunkt des Chromosoms, wie sie durch Auflaufen bei 42° und Reinitiation bei 33° gegeben sind, definierte Stellen auf dem Chromosom sind.

Eine mit ^{14}C-Thymin markierte Kultur wurde 55 min bei 42° inkubiert (Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls s. Tabelle 1.)

Tabelle 1: Protokoll zum Dichteshift-Experiment zur Initiation.





Dabei sollten die Chromosomen zu Ende replizieren. Dann wurde 10 min bei 33° inkubiert, um eine Initiation pro Chromosom zu erlauben. Nach dem Rückshift auf 42° wurde die Kultur geteilt, Teil $\underline{I}$ bekam sofort einen ^{3}H-Thymidin Puls, Teil $\underline{II}$ nach 10 min und Teil $\underline{III}$ nach 21 min. Nach dem Puls wurde jede Kultur gewaschen, in frischem Medium mit ^{14}C-Thymin gleicher spezifischer Aktivität resuspendiert und weiter für 30 min bei 42° inkubiert. Bei dieser zweiten 42°-Periode ist zu erwarten, daß die Chromosomen wieder das Ende der Runde erreichen. In den drei Kulturen sollten die Zellen also terminierte Chromosomen enthalten, die am Anfang ($\underline{I}$), in der Mitte ($\underline{II}$) oder am Ende ($\underline{III}$) durch einen ^{3}H-Puls markiert sind. Nun wurden die Zellen vom leichten (^{12}C-Glucose-$^{14}NH_4Cl$) Medium in schweres (^{13}C-Glucose-$^{15}NH_4Cl$) Medium überführt und weiter bei 33° inkubiert. Schweres Medium enthielt wiederum ^{14}C-Thymin gleicher spezifischer Aktivität. Der Zeitpunkt des shifts ins schwere Medium ist t = 0. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen. Diese wurden lysiert und die Dichte der DNA durch isopyknische Zentrifugation analysiert (siehe Material und Methoden). Die Gradienten wurden in 50 - 60 Fraktionen ausgetropft und die Verteilung von ^{3}H und ^{14}C in DNA verschiedener Dichte bestimmt.

In Figur 3 sind als Beispiele zwei Gradienten des Pulses $\underline{II}$ angegeben. Es sind die Zeitwerte 20 und 40 min dargestellt. Aus allen Gradienten wurden die Prozentsätze ^{3}H und ^{14}C DNA schwerer

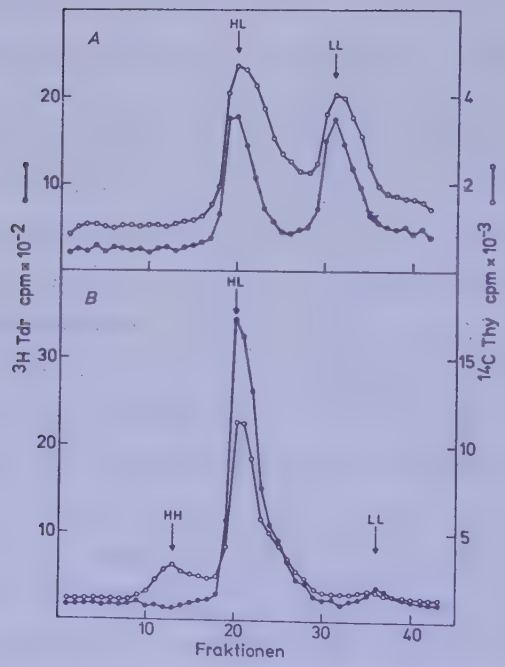


Abbildung 3: Dichtegradienten zur Initiation nach 42°-Behandlung von WM 301 dnaA 5.

Aus dem Experiment, das in Tabelle 1 beschrieben ist, sind als Beispiele für Dichtegradienten zwei Zeitwerte dargestellt, die durch den Puls II markiert wurden. Die Inkubation im schweren Medium dauerte bei (A) von 0 - 20 min, bei (B) von 0 - 40 min. Die Position, bei der schwere (HH), hybride (HL), bzw. leichte (LL) DNA bandet, ist durch Pfeile gekennzeichnet.
(●) ^{3}H-Thymidin; (o) ^{14}C-Thymin.

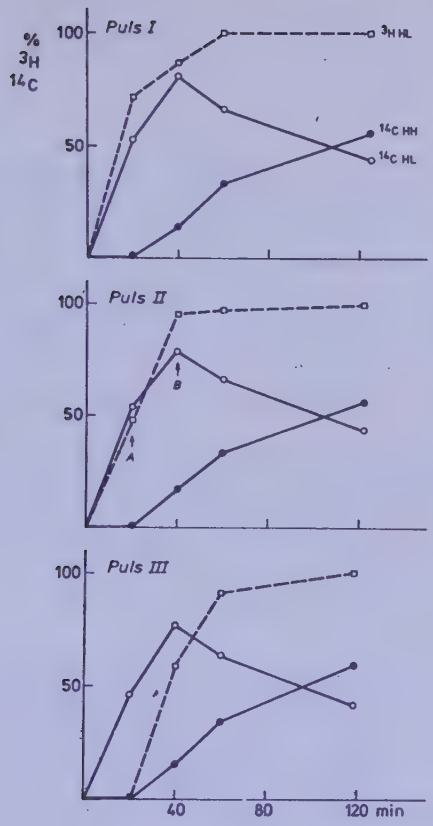


Abbildung 4: Replikation in WM 301 dnaA 5 nach 42°-Behandlung.

Dichteverschiebung durch Replikation in schwerem (^{13}C, ^{15}N) Medium von ^{14}C-Thymin markierten, terminierten Chromosomen, die einen ^{3}H-Thymidin-Puls enthalten:

I: am Anfang des Chromosoms (nach 10 min 33°, 0 min 42°)
II: in der Mitte des Chromosoms (nach 10 min 33°, 10 min 42°)
III: am Ende des Chromosoms (nach 10 min 33°, 21 min 42°).

Siehe Versuchsprotokoll in Tab. 1. Beim Puls II ist durch A und B angezeigt, welche Gradienten in Figur 3 dargestellt sind. Aus allen Dichtegradienten wurde der Prozentsatz an schwerer (HH) und hybrider (HL) ^{3}H, bzw. ^{14}C DNA bestimmt und gegen die Zeit im schweren Medium aufgetragen.

und hybrider Dichte bestimmt. Diese wurden in Figur 4 gegen den Zeitpunkt der Probenentnahme, d. h. der Zeit nach shift ins schwere Medium, aufgetragen.

Die Verschiebung von ^{14}C-Thymin in Material hybrider oder schwerer Dichte ist ein Maß für die gesamte Replikation. ^{3}H-Thymidin pulsmarkierte Chromosomenabschnitte sollten in der zweiten Replikationsrunde zur gleichen Zeit hybrid werden, zu der in der ersten Runde der ^{3}H-Thymidin Puls gegeben wurde, vorausgesetzt, daß bei beiden 42°-Perioden die Replikation bis zur gleichen Stelle erfolgt. Ist jedoch die Start/Stop Stelle zufällig verteilt und sind damit auch die ^{3}H-Thymidin Pulse an beliebigen Stellen des Chromosoms, erwartet man, daß ^{3}H-markierte und ^{14}C-markierte DNA gleichzeitig hybrid werden.

Der Vergleich des frühen Pulses $\underline{\text{I}}$ mit dem späten Puls $\underline{\text{III}}$ zeigt, daß der Verlauf der ^{14}C-Kurven erwartungsgemäß sehr ähnlich ist. Bis zu 45 min nach dem shift ins schwere Medium nimmt der Anteil hybrider ^{14}C-DNA zu. Noch bevor alle ^{14}C-DNA hybrid wird, tritt schwere ^{14}C-DNA auf. Dies zeigt, daß Neuinitiationen stattfinden bevor alle Chromosomen das Ende der Replikationsrunde erreicht haben. Der größere Teil der ^{3}H-Markierung des Pulses in Teil $\underline{\text{I}}$ wird früher hybrid als die ^{14}C-DNA. Umgekehrt verhält sich die ^{3}H-DNA des Pulses in $\underline{\text{III}}$. Der größere Teil davon wird erst hybrid, wenn schon 80 % der ^{14}C-DNA an hybrider Dichte bandet. Das zeigt, daß nach

der zweiten Inkubation bei 42° und Reinitiation bei 33° der früh gesetzte Puls wieder früh, der späte wieder spät repliziert wird. Nach beiden 42° Perioden wird also an der gleichen Stelle des Chromosoms neu initiiert.

3.1.4 Charakterisierung anderer Initiationsmutanten

Die wichtigen Experimente dieser Arbeit wurden nicht nur mit der Mutante dnaA 5, sondern auch mit anderen Initiationsmutanten durchgeführt.

Die Mutation dnaA 5 und dnaA 46 wurden in E. coli K12-Stämmen isoliert und charakterisiert (Carl, 1970; Hirota et al., 1968). Da sie für diese Arbeit in E. coli B/r WM 301 überführt wurden, werden sie hier nochmals ausführlich charakterisiert.

Die Mutanten dnaA 203, dnaA 204, dnaA 205, dnaA 211, dnaC 201, dnaC 215 und dnaI 208 wurden von Beyersmann et al. (1974) in E. coli WM 301 isoliert und charakterisiert.

Zur Charakterisierung des Stammes WM 301 dnaA 46 wurden die DNA- und Proteinsynthese und die restlichen Zellteilungen bei 42° gemessen.

Eine mit ^{3}H-Thymin und ^{14}C-Leucin markierte, exponentiell bei 30° wachsende Kultur wurde aufgeteilt und bei 30° und 42° weiterinkubiert. Dabei wurde der Einbau von ^{3}H-Thymin und ^{14}C-Leucin in säurefällbares Material bestimmt, bzw. die Zellzahl gemessen.

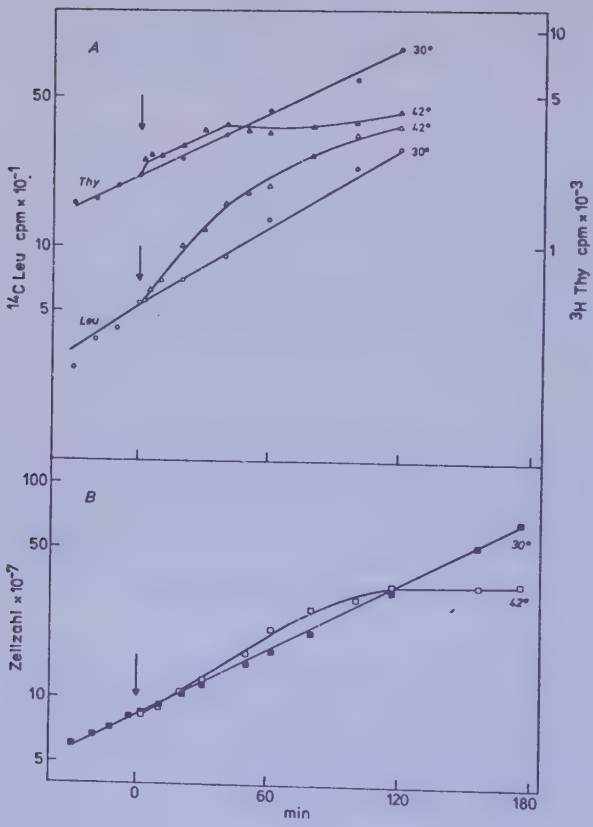


Abbildung 5: WM 301 dnaA 46: Charakterisierung als Initiationsmutante.

A) DNA- und Proteinsynthese bei 42°. Shift auf 42° bei Titer 1,6 x 10^8, angegeben durch Pfeile. Einbau von: ^{3}H-Thymin 30° (●), ^{3}H-Thymin 42° (▲), ^{14}C-Leucin 30° (o), ^{14}C-Leucin 42° (Δ).

B) Zellteilungen bei 42°. Shift auf 42° bei einem Titer von 8 x 10^7. Zellzahl 30° (■), Zellzahl 42° (□).

In Fig. 5 A sieht man, daß die DNA-Synthese bei 42° für 30 min weiterläuft und dann ein Plateau erreicht, nachdem die DNA Menge um den Faktor 1,5 zugenommen hat. Die Proteinsynthese ist bei 42° nicht blockiert, deren Rate ist bei 42° etwas höher als bei 30°. Die Zellteilungen (Fig. 5 B) erreichen nach ca. 120 min ein Plateau (Zunahme auf das 4,3-fache).

Die Mutation dnaA 46 ist im Stamm WM 301 etwas leaky. Bei Zelltitern unter 1 x 10^8 steigt die DNA Menge kurze Zeit nach Erreichen des 42°-Plateaus wieder an, jedoch mit reduzierter Rate. Auch die Zellteilungen übersteigen den erwarteten Faktor 2,6 (vergl. Abschnitt 3.1.2).

3.2 Reversibilität der Inaktivierung

Im ersten Teil der Resultate wurde der Stamm WM 301 dnaA 5 als Initiationsmutante charakterisiert. Das dnaA-Produkt ist also eines der Initiationsproteine. In diesem Teil soll gezeigt werden, daß thermoinaktiviertes dnaA-Produkt bei 33° renaturieren kann. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um die Synthese von Initiations-RNA bei 42° zu untersuchen.

3.2.1 Initiation in Gegenwart von Chloramphenicol nach Renaturierung des dnaA-Produktes.

Eine exponentiell wachsende Kultur von WM 301 dnaA 5 wurde bei 42° inkubiert. Nach einer Zunahme der DNA-Menge auf das 1,4-fache kommt

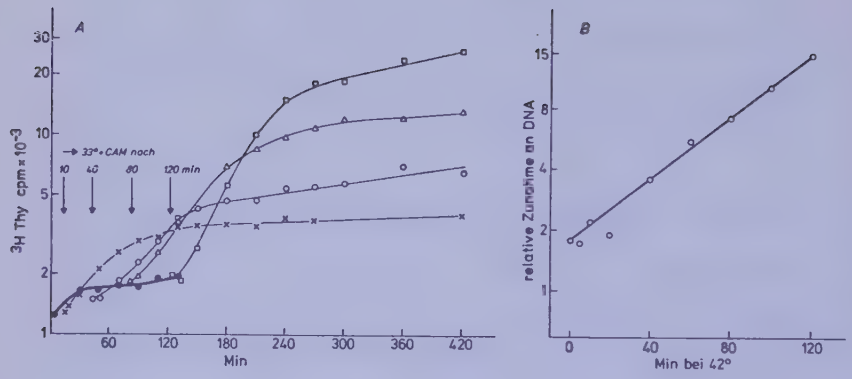


Abbildung 6: DNA-Synthese in WM 301 dnaA 5 nach Renaturierung bei 33° in Gegenwart von CAM.

A) Bei Titer 5 x 10^8 wurde die Kultur auf 42° geshiftet (● —— ●). Nach 10 min (x —— x), 40 min (o —— o), 80 min (Δ —— Δ) und 120 min (□—□) wurde CAM (30 µg/ml) zugegeben (s. Pfeile) und eine Minute später auf 33° zurückgeshiftet.

B) Relative Zunahme an DNA gegen die Zeit der 42°-Behandlung (o -- o). Das bei 33° + CAM in A) erreichte Plateau wurde auf das bei 42° erreichte Plateau (= 1) normiert.

die DNA-Synthese zum Stillstand (Fig. 6 A), d. h. neue Initiationen finden nicht mehr statt (siehe auch Teil 3.1.1). Nach verschiedenen Zeiten bei 42° wurden Teile der Kultur auf 33° zurückgeshiftet. Dabei wurde die Proteinsynthese gehemmt durch Zugabe von 30 µg/ml Chloramphenicol (CAM) oder durch Entzug einer essentiellen Aminosäure. Die DNA-Menge nimmt bei 33° sofort wieder zu, es finden also Neuinitiationen statt. Dies zeigt, daß das dnaA 5 Produkt bei 42° nicht irreversibel denaturiert ist, sondern bei 33° renaturieren kann und Initiation ohne Neusynthese von Protein erfolgt. Die DNA Menge erreicht nach einiger Zeit ein neues Plateau, dessen Höhe abhängig ist von der Zeit der Vorinkubation bei 42° (Fig. 6 A). In Fig. 6 B ist die relative Zunahme an DNA (Plateauwerte aus Fig. 6 A) über das 42°-Plateau gegen die Zeit der 42°-Behandlung aufgezeichnet. Aus dieser Darstellung folgt eine direkte Abhängigkeit zwischen der Dauer der 42°-Behandlung und der DNA-Menge, die nachfolgend bei 33° in Gegenwart von Chloramphenicol synthetisiert wird. Diese relative Zunahme an DNA kann bis zum 15-fachen betragen (Fig. 6 B). Es kann also bei 42° Initiationsprotein mindestens für 3 - 4 Initiationen angehäuft werden.

Aus diesen Experimenten ergeben sich folgende Aussagen:

1. Alle Initiationsproteine oder -faktoren, eingeschlossen das dnaA-Produkt, werden bei 42°, wie bei 33°, synthetisiert. Das dnaA-Produkt liegt bei 42° in einer inaktiven Form vor, kann bei 33° jedoch renaturieren und ist wieder funktionsfähig.

2. Während der Initiation ist Proteinsynthese nicht notwendig. Initiationsproteine können "auf Vorrat" angehäuft und später verwendet werden (Laurent, 1973).

3. Bei der Initiation wird mindestens eines der Initiationsproteine verbraucht oder inaktiviert, denn die DNA-Synthese läuft bei 33° in Gegenwart von CAM nicht unbegrenzt weiter, sie erreicht ein neues Plateau.

3.2.2 Initiation in Gegenwart von Rifampin nach Renaturierung des dnaA-Produktes.

Die Initiation der DNA Synthese ist nicht nur von Protein-, sondern auch von RNA-Synthese abhängig (Lark, 1972; Messer, 1972). Die Zugabe von Rifampin (Rif) stoppt sofort die Initiation der Replikation. Es wird angenommen, daß vor der Initiation eine spezifische Initiations-RNA synthetisiert wird, die die Funktion eines Primers für die DNA-Synthese hat (Wickner et al., 1972; Keller, 1972; Hayes und Szybalski, 1973).

Die Synthese der Initiationsproteine wird durch den 42°-Block nicht beeinflußt. Kann auch Initiations-RNA bei 42° synthetisiert werden? Entsprechend den Renaturierungs-Experimenten in Gegenwart von CAM wurden Versuche mit Rif durchgeführt.

Eine exponentiell wachsende Kultur wurde auf 42° geshiftet. Nach verschiedenen Zeiten bei 42° wurde zu einem Teil der Kultur 150 µg/ml

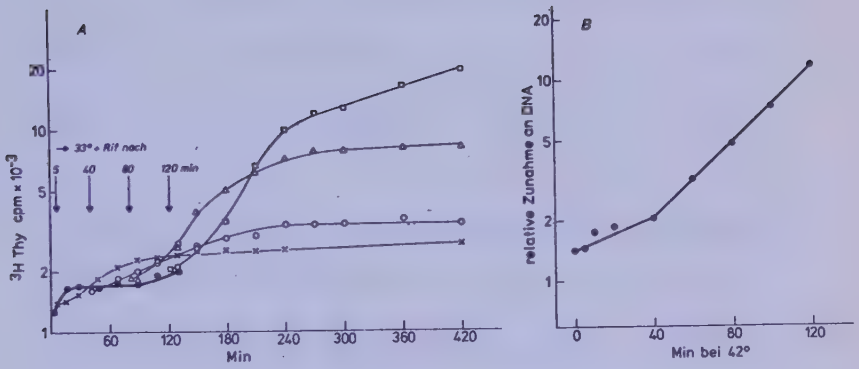


Abbildung 7: DNA-Synthese in WM 301 dnaA 5 nach Renaturierung bei 33° in Gegenwart von Rif.

A) Shift auf 42° bei Titer 5 x 10^8. Nach 5 min (x—x), 40 min (o—o), 80 min (△-△) und 120 min (□-□) wurde Rif (150 µg/ml) zugegeben (s. Pfeile) und eine Minute später auf 33° zurückgeshiftet. 42° (●——●).

B) Relative Zunahme an DNA gegen die Zeit der 42° Behandlung. Die Menge DNA, die bei 42° als Plateauwert erreicht wurde, wurde gleich 1 gesetzt. Die Zunahme an DNA bei 33° + Rif (Plateauwerte) über das bei 42° erreichte Plateau ist gegen die Zeit der Inkubation bei 42° aufgetragen.

Rif zugegeben und auf 33° zurückgeshiftet. Die Menge DNA wurde durch Einbau von ^{3}H-Thymin bestimmt (Fig. 7 A).

Beim shift von 42° auf 33° kann trotz der Zugabe von Rif wieder initiiert und repliziert werden. Die Menge DNA, die in Gegenwart von Rif bei 33° synthetisiert werden kann, ist wiederum abhängig von der Dauer der 42° Behandlung. Je später Rif zugegeben wird, desto höher liegt das erreichte Plateau (Fig. 7 A). Abb. 7 B zeigt wieder die Höhe der erreichten Plateauwerte aus Fig. 7 A bezogen auf das bei 42° erreichte Plateau, aufgetragen gegen die Zeit der 42°-Behandlung. Dauert die 42°-Vorbehandlung 60 min oder mehr, so ergibt sich eine Zunahme an DNA bei 33° + Rif von mehr als einem Faktor 2. Bei 42° kann also Initiations-RNA für mehr als eine Generation vorbereitet werden.

Aus diesen Daten folgt, daß die Synthese von Initiations-RNA vom 42°-Block weitgehend unabhängig ist, oder daß die Synthese der Initiations-RNA bei 42° zumindest initiiert wird, so daß sie beim Rückshift auf 33° durch gleichzeitige Zugabe von Rif nicht mehr hemmbar ist. Die Reaktion, die vom dnaA-Produkt beeinflußt wird, erfolgt also nach der Bindung von RNA-Polymerase an den Promotor für die Initiations-RNA.

Vergleicht man Abbildung 6 B und 7 B, so zeigt sich, daß bei 42° relativ mehr Initiationsprotein als Initiations-RNA vorbereitet ist.

Es ist also die Rate von Synthese und/oder Zerfall dieser Produkte etwas unterschiedlich. So erfolgt nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 42° in Gegenwart von CAM eine Zunahme an DNA um einen Faktor 5, mit Rif nur um einen Faktor 3. Die beiden Kurven (Fig. 6 B und 7 B) steigen mindestens bis 120 min an. Wird 60 min oder länger bei 42° inkubiert, so wird Initiationspotential (Initiationsproteine und Initiations-RNA) für mehr als eine Generation vorbereitet.

3.2.3 Replikation nach Renaturierung des dnaA-Produktes in Gegenwart von Rifampin oder Chloramphenicol.

In den letzten beiden Abschnitten wurde gezeigt, daß Initiationsprodukte, die unter nicht permissiven Bedingungen synthetisiert werden, bei 33° trotz Stop der Protein- und RNA-Synthese verwendet werden können. Um nachzuweisen, daß die Neusynthese an DNA nach der Renaturierung des dnaA-Produktes auf echten Initiationen beruht und nicht auf einer unkontrollierten DNA Synthese, wurde

1) ein Test auf Initiationen durch Messung der Zunahme der Zellzahl und

2) ein physikalischer Nachweis der Replikation des ganzen Chromosoms durch ein Dichteshift-Experiment durchgeführt.

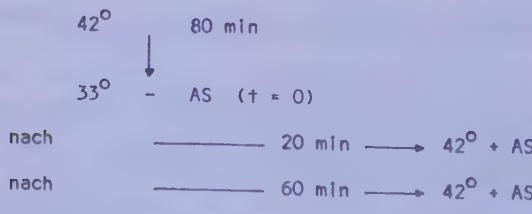
3.2.3.1 Zellteilung nach Initiation durch Renaturierung des dnaA-Produktes.

In Abschnitt 3.1.2 wurde die Abhängigkeit der Zellteilung von der Initiation der DNA-Synthese gezeigt. Jede erfolgte Initiation führt zur Replikation des ganzen Chromosoms und anschließend zur

Zellteilung. Selbst Initiationen, die bei 33° + CAM, 33° + Rif oder unter Aminosäure-Hunger (nach 42°-Behandlung) erfolgt sind, müßten ebenfalls im Prinzip zu Zellteilungen führen. Da jedoch für die eigentliche Zellteilung Proteinsynthese erforderlich ist, wurde in diesem Test Proteinsynthese wieder erlaubt (im Falle von 33° mit Aminosäure-Hunger wurden Aminosäuren zugegeben) und gleichzeitig zusätzliche Initiationen durch Inkubation bei 42° blockiert.

Eine ^{3}H-Thymin markierte Kultur wurde 80 min bei 42° inkubiert. Dann wurde die Kultur in Medium ohne benötigte Aminosäuren (AS) überführt und bei 33° weiter inkubiert. Nach 20 min (I) und 60 min (II) bei 33° - AS wurde erneut bei 42° + AS inkubiert. Über das ganze Experiment wurde die Menge der DNA und die Zellzahl gemessen. Protokoll siehe Tabelle 2.

Tabelle 2:



Experiment zur Initiation nach Renaturierung des dnaA-Produktes bei 33° - AS.

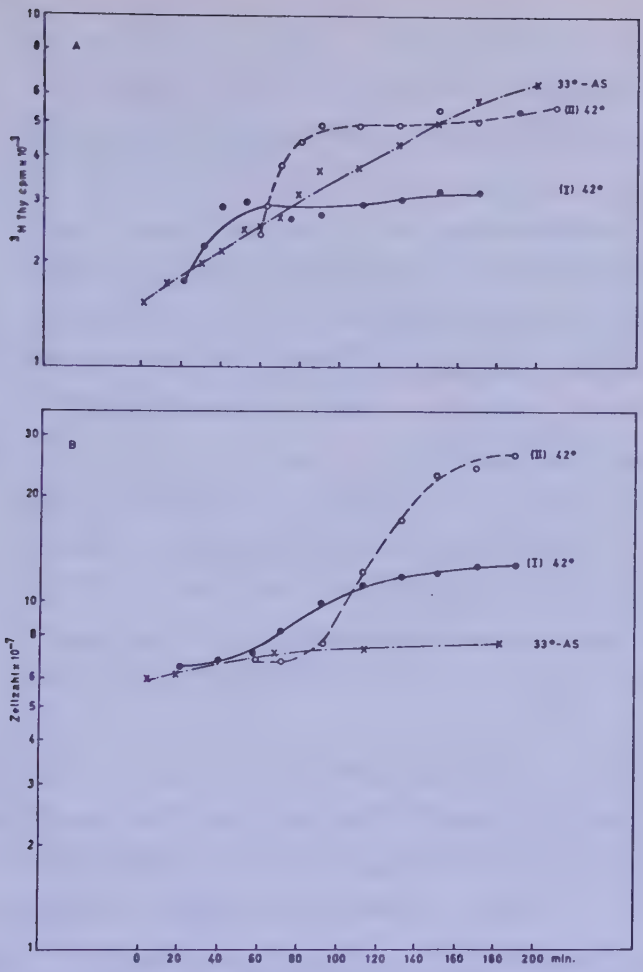


Abbildung 8: Initiation nach Renaturierung des dnaA-Produktes bei 33° ohne Aminosäuren (AS).

Eine Kultur von WM 301 dnaA 5 wurde beim Titer 4 x 10^7 auf 42° geshiftet. Nach 80 min bei 42° wurden die AS ausgewaschen. Die Zellen wurden in Medium ohne die benötigten AS resuspendiert und bei 33° inkubiert (t = 0). Nach weiteren 20 min wurde die Kultur geteilt, ein Teil blieb bei 33° - AS, der andere wurde auf 42° geshiftet, wobei die benötigten AS wieder zugefügt wurden (I). Nach 60 min bei 33° - AS wurde nochmals ein Teil abgespalten, auf 42° geshiftet und AS zugegeben (II)

In A) ist die DNA-Menge (Einbau von ^{3}H-Thymin), in B) die Zellzahl dargestellt. ^{3}H-Thymin-Einbau bei 33° - AS (x—·—x), bei 42° (I) (●——●), bei 42° (II) (o--o) Zellzahl bei 33° - AS (x—·—x), bei 42° (I) (●——●), bei 42° (II) (o---o).

In Abb. 8 A ist die DNA-Synthese, in Abb. 8 B die Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit nach der ersten 42° Periode aufgetragen. Die Synthesegeschwindigkeit vorhandener Replikationspunkte ist bei 42° höher als bei 33°, deshalb steigen die Kurven für die DNA-Synthese bei 42° in Abb. 8 A zunächst über die der Kontrolle bei 33° - AS an. 40 min nach dem shift auf 42° erreicht die Menge DNA in beiden 42° Kulturen ein Plateau; dabei liegt das Plateau der 60 min bei 33° - AS inkubierten Kultur (II) um den Faktor 1,7 höher als das der Kultur (I) (20 min 33° - AS). Analog der DNA-Synthese erfolgt die Zunahme der Zellzahl (Abb. 8 B). Die länger bei 33° - AS inkubierte Kultur erreicht einen höheren Zelltiter. Bei 33° - AS sind nur noch wenige Zellteilungen zu beobachten, da Proteinsynthese zur Zeit der Termination der Replikation für die Zellteilung erforderlich ist (Marunouchi and Messer, 1973).

Der Unterschied in der Menge DNA, die in den beiden Kulturen synthetisiert werden kann, beruht auf der Zahl an Neuinitiationen zwischen t = 20 und t = 60 min. Dieser Unterschied der beiden Plateaus um den Faktor 1,7 bedeutet, daß 85 % aller Chromosomen in diesem Zeitraum einmal initiieren konnten. Die erreichbare Zellzahl von Kultur (II) liegt um den Faktor 2 über der von Kultur (I), in guter Übereinstimmung mit der Zahl an Chromosomen, die initiiert haben. Die gesamte DNA-Synthese, die bei 33° - AS stattfand, beruht also auf normalen Initiationen. Denn würde fehlerhaft oder an falschen Stellen

initiiert, so könnte das Chromosom niemals vollständig repliziert und segregiert werden. Die Zellzahl der beiden Kulturen wäre gleich oder nur unwesentlich verschieden.

Ein ähnlicher Versuch wurde durchgeführt, bei dem Proteinsynthese durch Zusatz von CAM oder Rif blockiert wurde. Das Resultat ist identisch; auch hier entspricht die Zunahme an Zellen direkt der Zunahme an DNA.

Der Test beweist, daß die Reinitiation nach einer 42°-Behandlung in Gegenwart von CAM, Rif und unter Aminosäurehunger nicht ein Artefakt ist, sondern auf normalen Initiationen beruht.

3.2.3.2 Sequentielle Replikation nach Renaturierung des dnaA-Produktes.

Durch ein Dichteshift-Experiment sollte ergänzend gezeigt werden, daß bei der Reinitiation in Gegenwart von CAM oder Rif normale Initiationen stattfinden, d. h. das Chromosom sequentiell und vollständig repliziert wird.

Eine exponentiell wachsende Kultur, die mit ^{14}C-Thymin markiert war, wurde für 40 min bei 42° inkubiert, um die Chromosomen zu Ende replizieren zu lassen. Anschließend wurde für 10 min bei 33° Initiation erlaubt und danach auf 42° zurückgeshiftet. Direkt nach dem Rückshift auf 42°, also nahe am Initiationspunkt, wurde ein ^{3}H-Thymidin Puls (5 min) gegeben. Dann wurden die Zellen

Tabelle 3: Initiation nach Renaturierung des dnaA-Produktes.

exponentiell wachsende Zellen bei 33^{o}

42^{o} 40 min

33^{o} 10 min

^{3}H-Puls 42^{o} 5 min

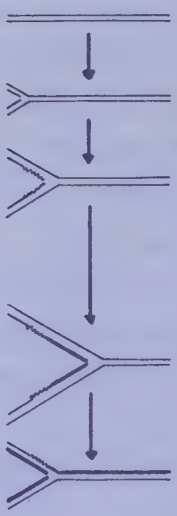
shift in (^{13}C, ^{15}N) - Medium; t = 0

42^{o} 30 min
Probe

33^{o} + CAM 33^{o} + Rif

Proben je nach 15, 30 und 60 min

erwartete Zustände der Chromosomen



Situation nach 15 min mit CAM

——— leichte ^{14}C-DNA (^{12}C, ^{14}N)
wwwww leichte ^{3}H-DNA (^{12}C, ^{14}N)
——— schwere ^{14}C-DNA (^{13}C, ^{15}N)

Der Prozentsatz an ^{3}H, bzw. ^{14}C-DNA schwerer und hybrider Dichte wurde aus den Gradienten berechnet und in Fig. 9 gegen die Zeit der Inkubation im schweren Medium aufgetragen.

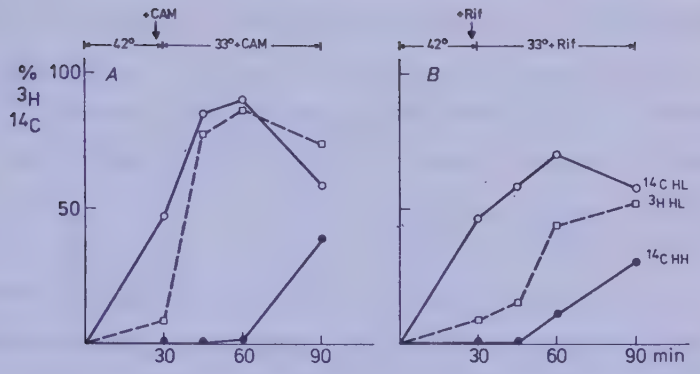


Abbildung 9: Replikation nach Renaturierung des dnaA-Produktes in Gegenwart von CAM oder Rif.

Anhand von Dichtegradienten wurde der Prozentsatz an hybrider (HL) und schwerer (HH) ^{3}H- bzw. ^{14}C-DNA ermittelt und gegen die Zeit im schweren Medium aufgetragen. Protokoll siehe Tab. 3.

A) Renaturierung in Gegenwart von CAM bei 33° nach 30 min Inkubation bei 42°.

B) Renaturierung in Gegenwart von Rif bei 33° nach 30 min Inkubation bei 42°.

Die Zeitpunkte der Zugabe von CAM oder Rif sind durch Pfeile gekennzeichnet.

in schweres Medium (^{13}C-Glukose-$^{15}NH_4Cl$) mit ^{14}C-Thymin überführt (t = 0). Während 30 min wurde bei 42° inkubiert, die erste Probe genommen und die Kultur geteilt. Zum einen Teil wurde CAM (30 µg/ml), zum anderen Rif (150 µg/ml) zugegeben und auf 33° zurückgeshiftet. Nach 45, 60 und 90 min in schwerem Medium wurden weitere Proben genommen, lysiert und im CsCl-Dichtegradienten aufgetrennt. Protokoll siehe Tabelle 3. Bei 42° nimmt der Anteil an hybrider ^{3}H-DNA nur geringfügig zu im Gegensatz zur ^{14}C-DNA. Das bedeutet, daß bei 42° kaum initiiert wird, die Chromosomen aber repliziert werden.

Nach Renaturierung bei 33° + CAM steigt der Anteil an hybridem ^{3}H-Material, es erfolgen also Neuinitiationen. In ähnlicher Weise, nur etwas langsamer, verläuft die Initiation in Gegenwart von Rif. 15 - 30 min nach der Renaturierung tritt schweres ^{14}C-Material auf. Nach 60 min sind 90 % der DNA hybrid geworden (Fig. 9 A), d. h. einmal repliziert.

Der Replikationsverlauf nach Renaturierung des dnaA-Produktes in Gegenwart von CAM oder Rif zeigt, daß initiiert und - zumindest bei 33° + CAM - das ganze Chromosom repliziert wird.

3.2.4 Renaturierungsversuche mit anderen Initiationsmutanten

Bei einer Reihe von anderen Initiationsmutanten wurde ebenfalls untersucht, ob deren Produkte renaturierbar sind. Dabei ergab sich, daß auch WM 301 dnaA 46 und zwei dnaC-Mutanten für renaturierbare Produkte kodieren. WM 301 dnaA 203, dnaA 205 und dnaA 211 können nach einer 42°-Behandlung bei 30° in Gegenwart vom CAM oder

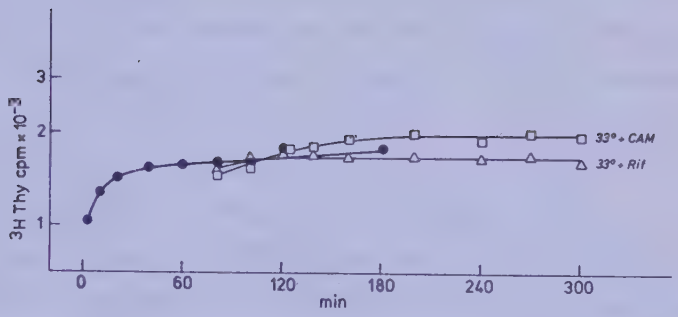


Abbildung 10: WM 301 dnaA 205: Versuch der Renaturierung des dnaA-Produktes in Gegenwart von CAM oder Rif

Die Kultur wurde bei einem Titer von 5×10^7 auf 42° geshiftet. Nach 80 min bei 42° wurde zu einem Teil der Kultur CAM (30 µg/ml), bzw. Rif (150 µg/ml) zugegeben und eine Minute später auf 30° zurückgeshiftet.
42° (O—O), CAM 30° (□—□), Rif 30° (△—△).

Rif nicht wieder initiieren. Das gleiche gilt für die Mutante dnaI 208. Als Beispiel für diese Gruppe der Mutanten wird ein Experiment mit dnaA 205 beschrieben.

WM 301 dnaA 205: Eine ^{3}H-Thymin markierte Kultur wurde auf 42° geshiftet. Nach 80 min bei nichtpermissiver Temperatur wurde zu einem Teil CAM (30 µg/ml) und zu einem anderen Teil Rif (150 µg/ml) zugegeben. Eine Minute später wurde auf 30° zurückgeshiftet. (siehe Figur 10).

Bei 30° + CAM oder Rif wird fast keine zusätzliche DNA mehr synthetisiert. Es kann also nicht mehr initiiert werden. Das dnaA-Produkt ist in diesem Fall nicht renaturierbar oder es wird bei 42° nicht synthetisiert. (Alle genannten Mutanten, die in Gegenwart von 30 µg CAM/ml keine zusätzliche DNA-Synthese zeigen, können aber in Gegenwart von 2 µg/ml reinitiieren).

WM 301 dnaA 46: Eine ^{3}H-Thymin markierte Kultur wurde auf 42° geshiftet. Nach 50 min bei 42° wurde zu einem Teil CAM (30 µg/ml) zu einem anderen Teil Rif (150 µg/ml) zugegeben und auf 30° zurückgeshiftet (siege Figur 11).

Nach dem Rückshift auf 30° nimmt die DNA-Menge um einen Faktor 4 über das erreichte Plateau bei 42° zu. Im Gegensatz dazu kann bei Hemmung mit Rif wesentlich weniger initiiert werden (Zunahme an DNA um Faktor 1,2). Diese Menge ist deutlich geringer, als

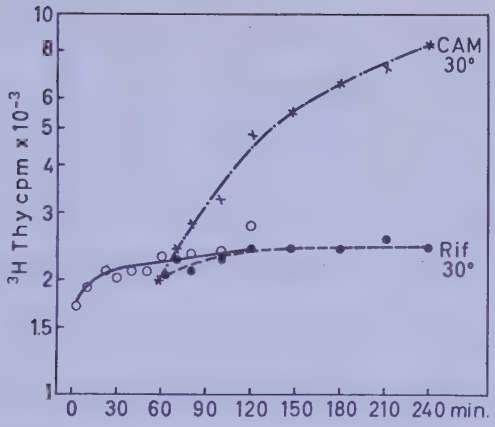


Abbildung 11: WM 301 dnaA 46: Renaturierung des dnaA-Produktes in Gegenwart von CAM oder Rif.

Die Kultur wurde bei einem Titer von 8 x 10^7 auf 42° geshiftet. Nach 60 min bei 42° wurde zu einem Teil der Kultur CAM (30 µg/ml), bzw. Rif (150 µg/ml) zugegeben und eine Minute später auf 30° zurückgeshiftet. 42° (o——o), CAM 30° (x——x), Rif 30° (●——●).

die in WM 301 dnaA 5 unter den gleichen Bedingungen synthetisierte DNA-Menge. Offenbar wird also bei 42° in diesem Stamm weniger Initiations-RNA bereitgestellt als bei WM 301 dnaA 5.

WM 301 dnaC 201 und dnaC 215: Eine mit ^{3}H-Thymin markierte Kultur der Mutante WM 301 dnaC 201 wurde auf 42° geshiftet. Nach verschiedenen Zeiten bei nichtpermissiver Temperatur wurde je ein Teil entnommen, CAM, bzw. Rif zugegeben und auf 30° zurückgeshiftet. In Fig.12 A ist die DNA Synthese gegen die Zeit aufgetragen. Das dnaC 201-Produkt ist renaturierbar; denn in Gegenwart von CAM wird wieder initiiert. Auch nach Zugabe von Rif wird bei 30° DNA synthetisiert. Bei 42° wird also auch Initiations-RNA angehäuft. Fig. 12 B - aus Fig. 12 A gewonnen, wie bei Fig. 6 B und 7 B beschrieben - zeigt, daß bei 42° Initiations-Proteine und Initiations-RNA in etwa gleichen Mengen und mit gleicher Rate angehäuft werden. Die Mutante dnaC 215 reagiert entsprechend: Initiations-Proteine und Initiations-RNA werden bei 42° angehäuft und können bei der permissiven Temperatur verwendet werden. Damit zeigen diese Stämme ein ähnliches Verhalten wie die Mutante WM 301 dnaA 5.

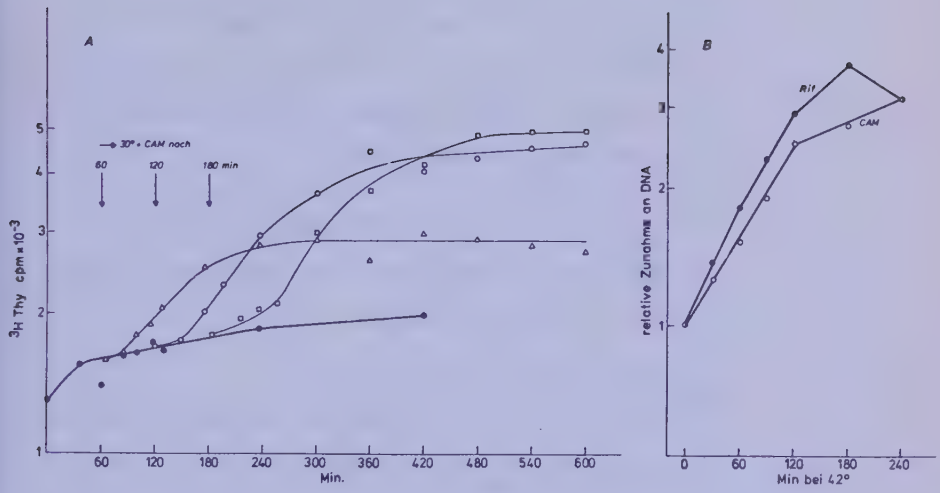


Abbildung 12: WM 301 dnaC 201: Renaturierung des dnaC-Produktes in Gegenwart von CAM oder Rif.

A) Die Kultur wurde bei Titer 2 x 10^7 auf 42° geshiftet (●—●). Nach 60 (△—△), 120 (○—○) und 180 min (□—□) bei 42° wurde zu je einem Teil CAM (30 µg/ml) bzw. Rif (150 µg/ml) (nicht aufgezeichnet) zugegeben und eine Minute später auf 30° zurückgeshiftet.

B) Relative Zunahme an DNA bei 30° + CAM und 30° + Rif. Die relative Zunahme der DNA bei 30° + CAM bzw. 30° + Rif über das 42°-Plateau wurde gegen die Zeit der 42°-Behandlung aufgetragen.

3.3 Funktion des dnaA-Produktes

Bei permissiver Temperatur wird das dnaA 5-Produkt denaturiert und verhindert damit den Prozess der Initiation. Die Synthese oder Vorbereitung von Initiationsproteinen und Initiations-RNA wird vom denaturierten dnaA-Produkt nicht beeinträchtigt. Nach Rückshift zu permissiver Temperatur wird das dnaA 5-Produkt renaturiert und die angehäuften Produkte können verwendet werden.

Es soll nun versucht werden, Aussagen über die Funktion von dnaA machen zu können, bzw. den Prozess, der von dnaA beeinflusst wird, zu analysieren.

3.3.1 Stimulierung der Initiation durch Hemmung der Proteinsynthese

3.3.1.1 Chloramphenicol in exponentiell wachsenden Zellen

Der Stamm E. coli WM 301 und alle davon abgeleiteten Stämme sind sehr empfindlich gegen Chloramphenicol. 30 µg/ml Chloramphenicol blockieren jegliche Proteinsynthese.

Zu einer bei permissiver Temperatur (33°), exponentiell wachsenden Kultur von WM 301 dnaA 5 wurden 30 µg/ml Chloramphenicol (CAM) zugegeben und die Rate der DNA-Synthese gemessen, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Kontrollrate nimmt exponentiell, entsprechend der Zunahme der Zellzahl zu (Abb. 13). Nach Zugabe von CAM steigt die

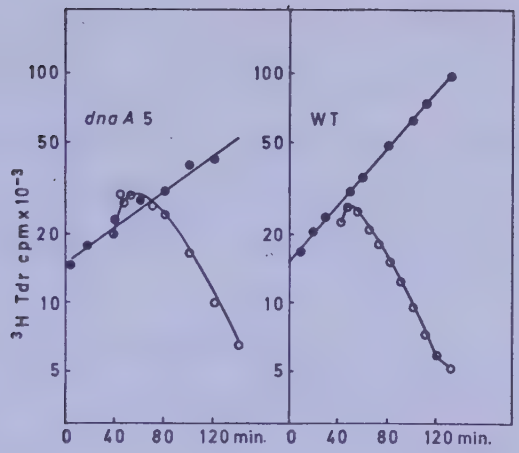


Abbildung 13: Rate der DNA-Synthese bei 33° nach Zugabe von CAM (30 µg/ml).

von WM 301 dnaA 5 und WM 301 (Wildtyp). (●——●) Kontrolle 33°, (o——o) 33° + CAM.

Rate der DNA-Synthese über diejenige der Kontrolle an und fällt dann nach 10 - 15 min wieder ab. Der gleiche Versuch mit dem Wildtyp WM 301 ist ebenfalls in Abb. 13 dargestellt. Nach Zugabe des Antibiotikums steigt die Rate nur noch minimal, bleibt aber immer unter der Kontrolle. Im Wildtyp sind also alle Proteine, die für eine Initiation erforderlich sind, einige Minuten vor der Initiation angehäuft (Ward and Glaser, 1969; Messer, 1972). Nachdem diese verbraucht sind, kann keine Neuinitiation mehr stattfinden und die Rate der DNA-Synthese sinkt ab, da mehr und mehr Chromosomen ihren Replikationszyklus beenden.

Für den starken Anstieg der Rate der DNA-Synthese in der Mutante WM 301 dnaA 5 sind zwei Erklärungen möglich:

1. Die Synthesegeschwindigkeit der vorhandenen Replikationspunkte nimmt zu, oder
2. Die Zahl der Replikationspunkte wird vermehrt, d.h. es erfolgt eine vorübergehende Stimulierung der Initiation.

Aus der Ratenmessung allein kann nicht entschieden werden, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft. Dies ermöglicht erst ein entsprechender Versuch, bei dem die Menge der DNA gemessen wird.

Eine mit ^{3}H-Thymin markierte Kultur, exponentiell bei 33° wachsend, wird einerseits mit CAM behandelt, andererseits ohne CAM auf 42° geshiftet, wobei die Menge der DNA als ^{3}H-Thymin in säurefällbarer Form gemessen wird (Abb. 14 A). Analog wurde die Restsynthese in

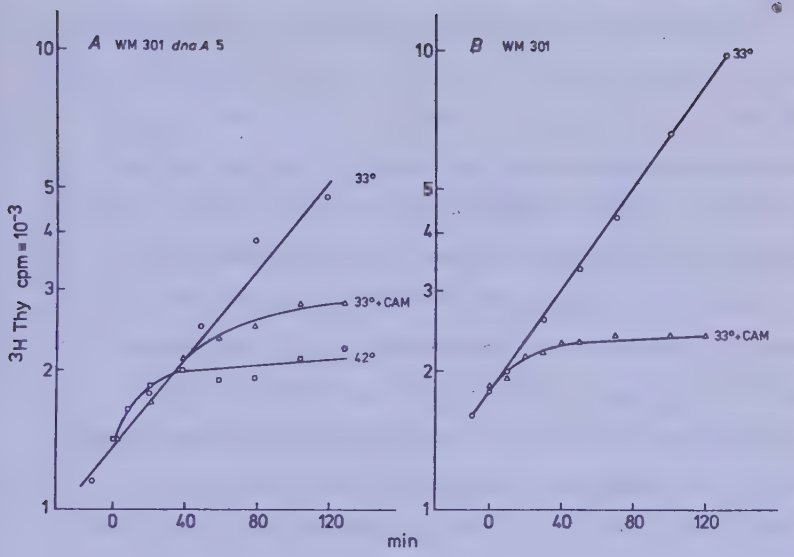


Abbildung 14: Menge der DNA-Synthese nach Zugabe von CAM bei 33° und shift auf 42°.

A) WM 301 dnaA 5

B) WM 301 (Wildtyp)

(O — O) Kontrolle 33°, (Δ — Δ) 33° + CAM, (□ — □) 42°

Gegenwart von CAM beim Wildtyp gemessen (Fig. 14 B). Die Menge DNA, die nach CAM-Zugabe synthetisiert werden kann, nimmt bei WM 301 dnaA 5 um ca. 100 % (Faktor 2) zu, beim Wildtyp um 40 % (Faktor 1,4). Bei 42° nimmt die DNA in der Mutante WM 301 dnaA 5 um 40 % (Faktor 1,4) zu, bis die Synthese stoppt. Das bedeutet, daß die Mutante nach CAM-Zugabe mehr DNA synthetisieren kann, als der Wildtyp und mehr als nach shift auf 42°. Bei WM 301 dnaA 5 wird entweder nach der CAM-Zugabe neu initiiert, oder die Zahl vorhandener Replikationspunkte ist größer als beim Wildtyp. Bei 42° kann bei der Mutante nicht mehr initiiert werden. Alle vorhandenen Wachstumspunkte können aber zu Ende replizieren. Wäre eine größere Zahl an Replikationspunkten bei der Mutante vorhanden, dann müßte - entgegen dem experimentellen Ergebnis - die restliche DNA-Synthese nach dem shift auf 42° und CAM-Zugabe bei 33° gleich hoch sein. Stimulierung der Syntheserate und erhöhte Restsynthese werden gleichermaßen beobachtet, wenn die Proteinsynthese anstatt durch Zugabe von CAM durch Entzug essentieller Aminosäuren blockiert wird. Die Beobachtung, daß bei WM 301 dnaA 5 eine Hemmung der Proteinsynthese zu einer Stimulierung der Initiation führt, muß bedeuten, daß es ein negatives Kontrollelement für die Initiation gibt. Dieses Kontrollelement müßte eine hohe turnover-Rate haben, so daß eine ausreichende Konzentration an Inhibitor oder Repressor durch dauernde Synthese aufrecht erhalten wird (näheres siehe Diskussion).

3.3.1.2 Rifampin in exponentiell wachsenden Zellen

Durch CAM kann bei WM 301 dnaA 5 die Initiation stimuliert werden. Rifampin (Rif) blockiert die Transkription und damit ebenfalls die Proteinsynthese. Es stellt sich die Frage, ob Rif den gleichen Effekt hat wie CAM.

Eine exponentiell bei 33° wachsende Kultur wurde mit Rif (150 µg/ml) behandelt und dabei die Rate der DNA-Synthese gemessen. In Fig. 15 A steigt die Rate der DNA Synthese in der Rif-Kultur über diejenige der Kontrolle. Die Periode mit erhöhter Rate ist aber weit kürzer mit Rif als mit CAM und der Anstieg der Rate ist geringer.

In einem analogen Experiment wurde zu einer ^{3}H-Thymin markierten Kultur Rif zugegeben und die DNA-Menge gemessen (Fig. 15 B). Die Zunahme an DNA beträgt hier 80 % (Faktor 1,8). Damit wird auch durch Rif die Initiation der Replikation kurzzeitig stimuliert.

In Tabelle 4 sind die DNA-Mengen zusammengestellt, die nach Zugabe von Antibiotika oder 42° Behandlung noch synthetisiert werden können.

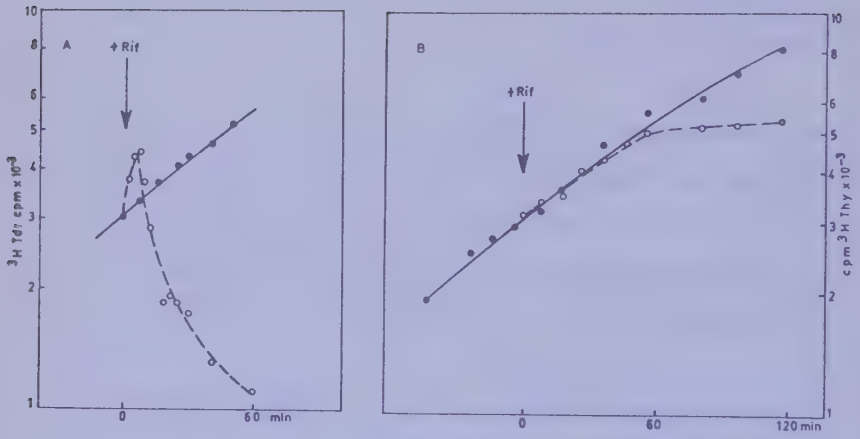


Abbildung 15: DNA-Synthese nach Zugabe von Rif (150 µg/ml) bei 33° (WM 301 dnaA 5).

Der Zeitpunkt der Zugabe des Antibiotikums ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.
A) Rate der DNA-Synthese; B) Menge der DNA-Synthese
(●——●) Kontrolle 33°, (o——o) Rif 33°.

Tabelle 4: Restliche DNA-Synthese (in Faktoren) nach Antibiotika-Zugabe bei 30° bzw. 33° oder shift auf 42°.

	CAM	Rif	42°
301 WT	1,4 - 1,5	1,4 - 1,45	-
dnaA 5	1,9 - 2,4	1,7 - 1,9	1,4
dnaA 46	2,3	1,4	1,4
dnaA 203	1,5	1,6	1,6
dnaA 204	1,6	-	1,6
dnaA 205	1,6	1,5	1,5
dnaA 211	1,7	1,6	1,6
dnaC 201	1,5	1,6	1,5
dnaI 208	1,3	1,6	2,0

3.3.1.3 Einfluß der Hemmung der Proteinsynthese auf die Initiation bei anderen Initiationsmutanten

Ist die Stimulierbarkeit der Initiation eine Besonderheit der dnaA 5 Mutante? Zeigen andere dnaA Mutanten oder andere Initiationsmutanten ähnliche Eigenschaften?

Als Vorversuch wurde bei allen Mutanten gemessen, wieviel DNA nach CAM-, bzw. Rif-Zugabe, im Gegensatz zu 42°, synthetisiert wird.

Bei 4 dnaA Mutanten (dnaA 203, dnaA 204, dnaA 205, dnaA 211), einer dnaC Mutante (dnaC 201) und einer dnaI Mutante (dnaI 208) wurde nach Zugabe von CAM oder Rif jeweils eine Zunahme an DNA von 40 - 60 %, d. h. ein Faktor 1,4 - 1,6 gemessen. Die Werte mit Antibiotikum stimmen relativ gut überein mit der DNA-Synthese bei 42° oder dem erwarteten Wert für das Zuendereplizieren aller angefangenen Chromosomen. Die gemessenen Werte sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Bei diesen Mutanten kann also nach Stop der Proteinsynthese keine Stimulierung der Initiation erwartet werden.

Lediglich der Stamm E. coli WM 301 dnaA 46 zeigte ähnliches Verhalten wie WM 301 dnaA 5: In Abb. 16 sind Raten- und Mengenmessungen der DNA in exponentiell wachsenden Zellen mit Antibiotika-Behandlung angegeben. Sie wurden analog den in Fig. 13, 14 und 15 gezeigten Experimenten durchgeführt. Die Rate der DNA-Synthese (Abb. 16 A) steigt nach CAM-Zugabe stark an und fällt erst nach ca. 20 min wieder ab. Im Gegensatz dazu fällt die Rate nach Zugabe von Rif sofort ab. Bei der Mengenmessung (Abb. 16 B) beobachtet man, daß in Gegenwart von CAM wesentlich mehr DNA synthetisiert wird als mit Rif. Nach CAM-Zugabe nimmt die DNA um den Faktor 2 - 2,4 zu. Die Menge DNA, die nach Rif-Zugabe noch synthetisiert wird, ist fast identisch mit der Restsynthese bei 42° (Faktor 1,4 - 1,5).

Auch in WM 301 dnaA 46 werden also Initiationen durch den Stop der Proteinsynthese stimuliert. In Gegenwart von Rif können dagegen

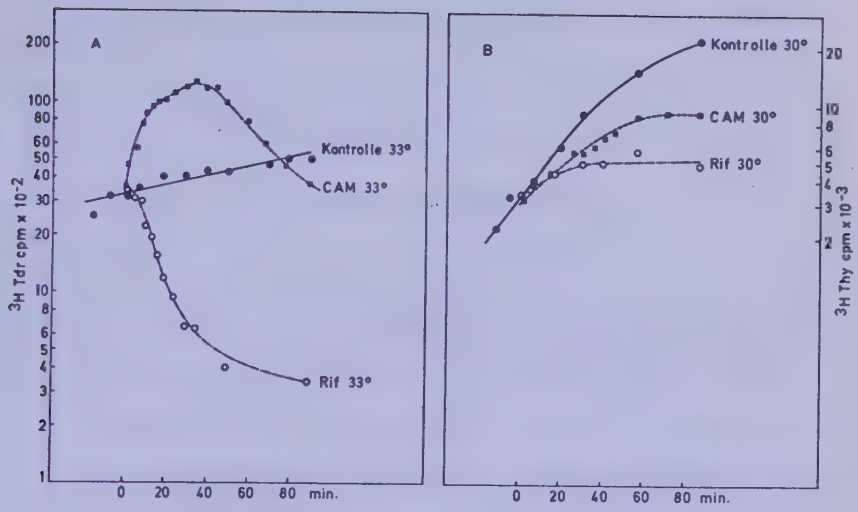


Abbildung 16: WM 301 dnaA 46: DNA-Synthese nach Zugabe von CAM (30 µg/ml) oder Rif (150 µg/ml).

A) Rate der DNA-Synthese bei 33°

B) Menge der DNA-Synthese bei 30°

(●—●) Kontrolle, (□--□) mit CAM, (○—○) mit Rif.

keine zusätzlichen Initiationen stattfinden. Der Stamm WM 301 dnaA 46 unterscheidet sich in dieser Hinsicht von dnaA 5.

Dies ist in Übereinstimmung mit dem in Fig. 11 gezeigten Experiment, in dem gezeigt wurde, daß bei dnaA 46 bei 42° keine Initiations-RNA angehäuft werden kann. Trotz Renaturierung des dnaA-Produktes erfolgte dort in Gegenwart von Rif keine DNA-Synthese nach einer Vorbehandlung bei 42°.

3.3.2 Verzögerung der Initiation

Das weiter unten beschriebene Dichteshift-Experiment legt es nahe zu vermuten, daß das dnaA-Produkt der Mutante dnaA 5 auch bei permissiver Temperatur nicht voll aktiv ist. Man könnte sich vorstellen, daß ein Gleichgewicht zwischen aktivem und denaturiertem dnaA-Protein besteht. Es wäre also möglich, daß die Verfügbarkeit von aktivem dnaA-Produkt das limitierende Element für die Initiation ist, während alle anderen Bedingungen für ein Initiationsereignes erfüllt sind. Sobald inaktives dnaA-Produkt in einem solchen Gleichgewicht aktiv wird oder seine Wirkung kompensiert ist, kann Initiation erfolgen. Mit den Elementen des in der Einleitung vorgestellten Modells ausgedrückt würde das bedeuten, daß alle für eine Initiation erforderlichen Proteine angehäuft sind, das Initiations-RNA-Operon aber durch teilweise denaturierten dnaA-Repressor superreprimiert ist.

Hemmung der Proteinsynthese würde dann diese Repression auflösen. Stimulierung würde also bedeuten, daß superreprimierte, sozusagen auf "Warteposition" liegende Initiationskomplexe starten können. Diese Hypothese würde auch erklären, warum die DNA-Replikation nur in dnaA-Mutanten mit renaturierbarem dnaA-Produkt stimuliert werden kann, denn in den anderen Mutanten kann sich kein Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem dnaA-Produkt ausbilden.

Dieses Konzept soll folgendermaßen geprüft werden:

1. Falls es Initiationskomplexe auf "Warteposition" gibt, müßte die Initiation gegenüber dem Wildtyp bei permissiver Temperatur verzögert sein.

2. Eine solche Verzögerung müßte mit ansteigender (halb-permissiver) Temperatur zunehmen.

3.3.2.1 Verzögerung der Initiation bei 33°

Im folgenden soll der Replikationsverlauf beim Wildtyp und bei der Mutante bei permissiver Temperatur verglichen werden. Es soll dabei untersucht werden, wann eine bestimmte Stelle eines Chromosoms, markiert durch einen ^{3}H-Thymidin-Puls, in exponentiell wachsenden Zellen zum zweiten Mal repliziert wird.

In Glukose-Minimalmedium (siehe Material und Methoden) haben die Chromosomen einen Wachstumspunkt (Lark, Repko, and Hoffman, 1963). Die markierte Stelle des Chromosoms sollte also unter diesen Bedingungen nach einer Replikationsrunde im schweren Medium in der Dichte hybrid werden. Die Generationszeit bei 33° beträgt beim Wildtyp 45 Minuten, bei der Mutante dnaA 5 55 Minuten.

Zu einer ^{14}C-Thymin markierten, exponentiell bei 33° wachsenden Kultur wurde ^{3}H-Thymidin zugegeben. Nach 5 min wurde überschüssiges ^{3}H-Thymidin ausgewaschen. Die Zellen wurden in schweres (^{13}C-Glukose, $^{15}NH_4Cl$) Medium überführt, weiter bei 33° inkubiert und Proben entnommen. Diese wurden lysiert und im CsCl-Dichtegradienten analysiert (siehe Material und Methoden). In Tabelle 5 ist das Protokoll für das Experiment angegeben.

Tabelle 5: Protokoll zu Experiment in Fig. 17

exponentiell wachsende Zellen von
WM 301 und von WM 301 dnaA 5
↓
^{3}H-Puls 5 min 33°
↓
shift in (^{13}C-^{15}N) Medium, 33°, t=0

Für jeden Gradienten wurde bestimmt, wieviel ^{3}H, bzw. ^{14}C DNA sich in hybrider und schwerer Position befindet. Die Prozentzahlen dieser

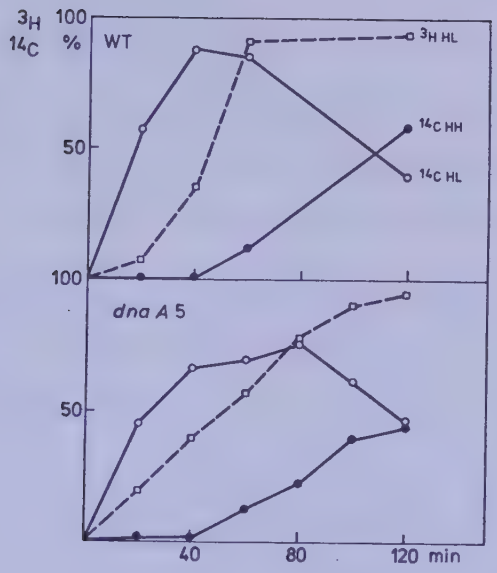


Abbildung 17: Replikation exponentiell wachsender Zellen von Wildtyp WM 301 und WM 301 dnaA 5.

Aus Dichtegradienten wurde der Prozentsatz an hybrider (HL) und schwerer (HH) ^{3}H- bzw. ^{14}C-DNA bestimmt und gegen die Zeit in schwerem Medium aufgetragen.

Werte wurden in Abhängigkeit von der Zeit der Probenentnahme in Fig. 17 aufgetragen. Fig. 17 stellt die Replikation vom Wildtyp WM 301 und der Mutante dnaA 5 dar. Die Replikation im Wildtyp verläuft wie erwartet: Die ^{3}H markierte DNA wird nach ungefähr einer Generation repliziert und damit in der Dichte hybrid. Die mit ^{14}C markierte DNA wird kontinuierlich hybrid, bis sie bei 40 min zu 90 % an dieser Dichte bandet. Durch den Beginn einer neuen Replikationsrunde tritt schweres ^{14}C-Material auf. Dieses nimmt nun langsam auf Kosten von hybrider ^{14}C DNA zu.

Die Replikation der ^{14}C-DNA verläuft in der Mutante dnaA 5 ähnlich wie im Wildtyp. Nach 40 min sind 65 % der ^{14}C-DNA hybrid. Die nächste Replikationsrunde führt wie im Wildtyp zu schwerer ^{14}C-DNA. Die Replikation des ^{3}H-Thymidin Pulses erfolgt im Mittel später als im Wildtyp und ist über einen längeren Zeitraum verteilt. Nach 60 min liegt erst 56 % der ^{3}H-DNA in hybrider Dichte vor und erst nach 120 min ist die ganze ^{3}H-DNA repliziert. In allen Experimenten findet man vor Ablauf einer Generation etwas ^{3}H-DNA an hybrider Dichte, eine Beobachtung die schon von Lark et al (1963) gemacht wurde. Eine mögliche Erklärung dafür ist Repairsynthese.

Die auffallend späte Replikation einiger Chromosomenabschnitte in der Mutante dnaA 5 kann entweder auf Verlangsamung der Replikationsgeschwindigkeit oder auf einer Verzögerung der Initiation beruhen. Wäre die Replikation verlangsamt, die Initiationsfrequenz aber normal, so hätten die Chromosomen mehr als einen Replikationspunkt. Diese Möglichkeit wurde schon in Abschnitt 3.3.1.1 widerlegt.

Ist nur ein Replikationspunkt pro Chromosom vorhanden, so muß die Verzögerung der Replikation an einer Verzögerung der Initiation liegen. Ein Teil der Zellen initiierte wie im Wildtyp nach 40 min, denn nach dieser Zeit tritt bei beiden Stämmen schweres ^{14}C-Material auf. Ein anderer Teil der Population verzögert die Initiation (im Gegensatz zum Wildtyp) so, daß die letzten Initiationen um ungefähr eine Generation verspätet sind: In sehr spät initiierenden Zellen werden die ^{3}H-Thymidin markierten Chromosomenabschnitte erst nach 80 - 100 min repliziert. Damit gibt es Chromosomenteile, die noch nicht repliziert sind, wenn in einigen Zellen schon neuinitiiert wird. Es tritt also schweres ^{14}C-Material auf, bevor die ganze ^{14}C-DNA an hybrider Dichte bandet.

Die Mutante dnaA 46 ist neben dnaA 5 die einzige, die durch Hemmung der Proteinsynthese in der Initiation stimulierbar ist. Um nachzuweisen, ob auch die Mutante dnaA 46 im Dichtegradienten eine Verzögerung zu erkennen gibt, wurde mit dieser das gleiche Experiment durchgeführt. Dabei zeigt sich, daß der Replikationsverlauf der Mutante dnaA 46 derjenigen von dnaA 5 bei 33° sehr ähnlich ist. Die Replikation der ^{3}H-markierten DNA erstreckt sich über einen sehr weiten Zeitbereich.

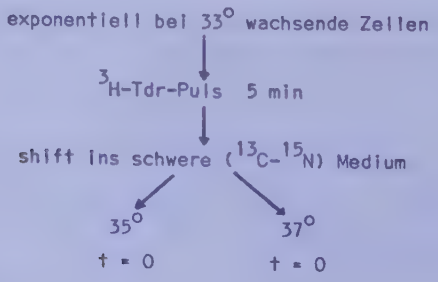
Die Initiation der DNA-Synthese ist also bei permissiver Temperatur in der Mutante dnaA 46 wie in dnaA 5 verglichen mit dem Wildtyp WM 301 verzögert.

3.3.2.2 Verzögerung der Initiation bei verschiedenen Temperaturen

Die Verzögerung der Initiation bei 33° wurde durch ein Dichteshift-Experiment nachgewiesen, bei dem die Replikation der Mutante dnaA 5 mit dem Wildtyp 301 verglichen wurde (vergl. Fig. 17). Im folgenden soll durch ein analoges Experiment bei höheren Temperaturen untersucht werden, ob diese bei 35° und 37° noch deutlicher ausgeprägt ist.

In einer ^{14}C-Thymin markierten, exponentiell bei 33° wachsenden Kultur, wurde ein kurzer Chromosomenabschnitt durch einen ^{3}H-Thymidin-Puls (5 min) markiert. Dann wurden die Zellen in schweres (^{13}C-Glukose, $^{15}NH_4Cl$) Medium mit der gleichen spezifischen Aktivität an ^{14}C-Thymin überführt. Im Gegensatz zum analogen Experiment (Tab. 5, Fig. 17) bei 33°, wurde nun hier bei 35°, bzw. 37° inkubiert. 30, 60, 90, 130 und 180 min nach shift ins schwere Medium wurden Proben genommen. Diese wurden lysiert und im CsCl-Dichtegradienten analysiert. Protokoll siehe Tabelle 6.

Tabelle 6: Experiment zu Abb. 18



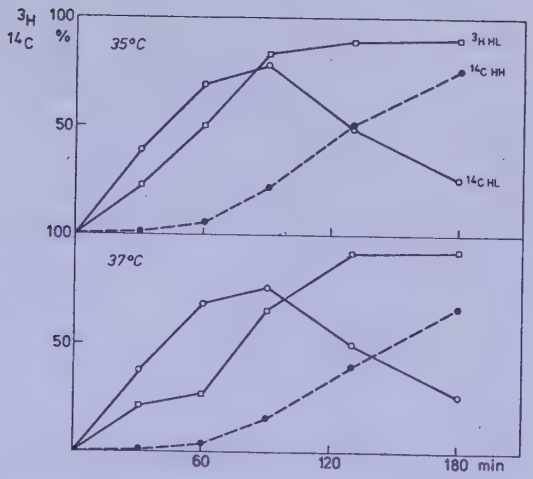


Abbildung 18: Replikation von WM 301 dnaA 5 bei 35° und 37°.

Der prozentuale Anteil an hybrider (HL) und schwerer (HH) ^{3}H-bzw. ^{14}C-DNA wurde aus den Gradienten bestimmt und gegen die Zeit im schweren Medium aufgetragen.

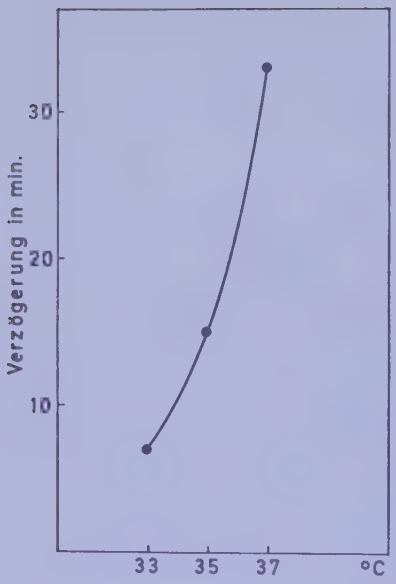


Abbildung 19: Verzögerung der Initiation von WM 301 dnaA 5 bei 33° - 37° relativ zum Wildtyp WM 301.

Die Initiation von WM 301, d. h. die Zeit bei der 50 % der ^{3}H-DNA hybrid geworden ist (siehe Fig. 17), ist die Bezugszeit (0 min). Die Differenz der entsprechenden Werte von WM 301 dnaA 5 bei 33° (Abbildung 17), 35° und 37° (Abbildung 18) wurde gegen die Temperatur aufgetragen.

Anhand der Gradienten wurde bestimmt, wieviel Prozent ^{3}H, bzw. ^{14}C-DNA an Hybrider und schwerer Dichte bandet. Die errechneten Prozentzahlen aller Gradienten wurden in Fig. 18 in Abhängigkeit der Inkubationszeit im schweren Medium aufgetragen.

Die Verschiebung ^{14}C-markierter DNA an hybride und schwere Dichte erfolgt in beiden Kulturen etwa gleich schnell (Fig. 18). Das Hybridwerden der ^{3}H-DNA gibt die Replikation der durch Puls markierten Chromosomenteile wieder. Es ist ein Maß für die Frequenz der Reinitiation. Bei 35° ist nach 60 min 50 % ^{3}H in hybrider Dichte vorhanden, bei 37° erst nach 78 min. Die Verzögerung der Initiation nimmt also von 35° bis 37° zu.

In Fig. 19 ist die Verzögerung der Initiation von 33° bis 37° im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Aus Fig. 17 ist zu entnehmen, daß beim Wildtyp 301 nach 46 min 50 % der DNA hybrid geworden ist. Entsprechend wurde die Zeit, zu der 50 % der ^{3}H-DNA hybrid geworden ist für die Mutante dnaA 5 bei 33° (aus Fig. 17), bei 35° und 37° aus Fig. 18 entnommen. Die Zeitdifferenz zwischen den Werten der Mutante dnaA 5 und dem Wildtyp 301 wurde in Fig. 19 gegen die Temperatur aufgetragen.

In Figur 19 zeigt sich deutlich, daß die Zeit, die zwischen zwei aufeinanderfolgende Replikationen des gleichen Chromosomenabschnittes vergeht, mit ansteigender Temperatur zunimmt.

3.3.3 Temperaturabhängigkeit der Stimulierung und der Verzögerung der Initiation.

Stimulierung der Initiation durch Hemmung der Proteinsynthese und Verzögerung der Initiation bei permissiver Temperatur müßten korreliert sein, wenn die Stimulierbarkeit auf der vorherigen Hemmung oder Verzögerung der Initiation beruht. Je stärker die Initiation - bei ansteigender Temperatur - verzögert ist, desto deutlicher müßte die Stimulierung sichtbar werden. Es müßte also auch die Stimulierung der Initiation mit ansteigender Temperatur stärker ausgeprägt sein.

Exponentiell bei 33° wachsende Kulturen von WM 301 dnaA 5 wurden für 2 Stunden bei 35°, 37° bzw. 39° inkubiert. Dann wurde jede Kultur geteilt, je zur einen Hälfte CAM (30 µg/ml) zugegeben und die Rate der DNA-Synthese gemessen (Fig. 20). In allen drei CAM behandelten Kulturen steigt die Rate des Thymidin-Einbaus sehr schnell bis zum 2 - 4-fachen der Kontrollrate an und fällt erst nach 30 - 40 min wieder ab.

Die Erhöhung der Rate der DNA-Synthese ist bei 35° wesentlich stärker ausgeprägt als bei 33°. Bei 37° und 39° ist der Effekt am deutlichsten sichtbar. Bei 42° hat CAM keine stimulierende Wirkung mehr; mit und ohne Antibiotikum erfolgt keine DNA Synthese.

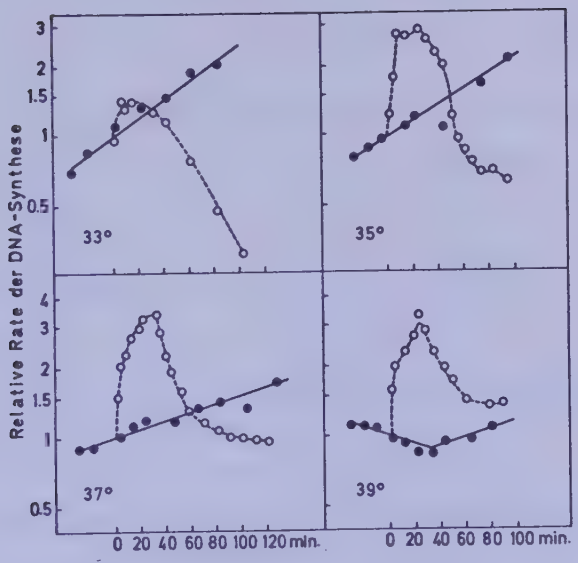


Abbildung 20: Rate der DNA-Synthese nach Zugabe von CAM (30 µg/ml) bei 33°, 35°, 37° und 39°.

Die Kulturen wurden vor Zugabe von CAM während zwei Stunden bei 35°, 37° bzw. 39° vorinkubiert. Der Zeitpunkt der Zugabe von CAM wurde t = 0 gesetzt. (●——●) Kontrolle, (o---o) CAM.

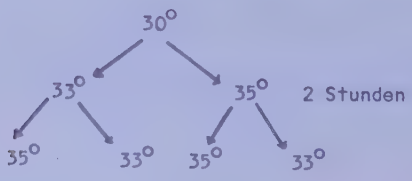
Es fällt jedoch auf, daß die Frequenz der Initiationen nach Zugabe von CAM, d. h. die Anfangssteigung der Stimulierungskurven, von 33° bis 39° fast gleich bleibt, die vermutlich immer die maximale Rate erreicht. Um die Ursache der Stimulierung besser zu verstehen, sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Wie verändert sich die DNA-Synthese-Rate beim shift von 33° auf 35° und umgekehrt?
2. Welche Rolle spielt die Temperatur der Vorinkubation für das Ausmaß der Stimulierung?
3. Welcher Anteil der Zellen kann durch CAM stimuliert werden?

3.3.3.1 DNA-Syntheserate nach Temperaturshift

Eine exponentiell bei 33° wachsende Kultur von dnaA 5 wurde aufgeteilt, und ein Teil bei 33°, der andere bei 35° für 2 Stunden inkubiert. Nach dieser Vorinkubation wurden die beiden Kulturen nochmals in je einen Teil aufgespalten und die Rate der DNA-Synthese bei 33° und 35° gemessen. Vergl. Protokoll in Tabelle 7.

Tabelle 7: Ratenmessungen durch ^{3}H-Thymidin-Pulse bei Temperaturshifts



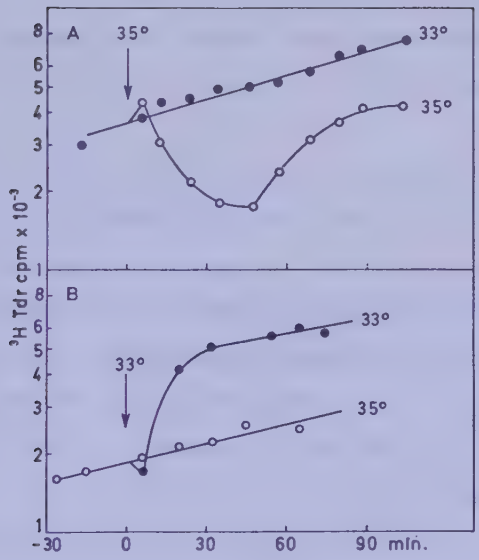


Abbildung 21: Rate der DNA-Synthese bei 33° und 35°.

A) Shift von 33° auf 35°.

B) Shift von 35° auf 33°.

(●—●) 33°, (o—o) 35°.

Beim shift von 33° auf 35° (Fig. 21 A) fällt die Syntheserate während ungefähr 40 min ab. Danach steigt die Kurve von neuem wieder an. Das Abfallen der Rate ist damit zu erklären, daß die vorhandenen Wachstumspunkte bis zum Chromosomenende fertig replizieren, Neuinitiationen aber gehemmt sind. Erst nach 50 min nimmt die Rate der DNA Synthese durch Neuinitiationen wieder zu.

Dieses Verhalten wird erwartet, wenn die Initiation durch die Initiationskomplexe bei 35° stärker verzögert ist, als bei 33°, die Synthese neuer Komplexe aber mit normaler Rate erfolgt. Da alle Komplexe mehr oder weniger gleichmäßig verzögert sind, sollte dann nach Ablauf der ersten Verzögerungsperiode die Rate der DNA-Synthese durch die Rate der Neusynthese von Initiationskomplexen bestimmt werden.

Die mittlere Verzögerung der Initiation, wie sie in diesen Temperaturshift-Experimenten bestimmt wird, muß unterschieden werden von der Verzögerung individueller Initiationskomplexe, die ohne Veränderung der Temperatur in Dichteshiftexperimenten bestimmt werden kann (siehe Abschnitt 3.3.2).

Beim umgekehrten shift, von 35° auf 33° (Fig. 21 B), steigt die Syntheserate steil an. Dies kann nur durch erhöhte Initiationsfrequenz erklärt werden. Initiationen, die bei 35° noch gehemmt waren, können durch den Temperaturabfall stimuliert, erfolgen.

Nachdem diese Initiationen erfolgt sind, pendelt sich die Syntheserate langsam wieder auf ein Normalmaß ein.

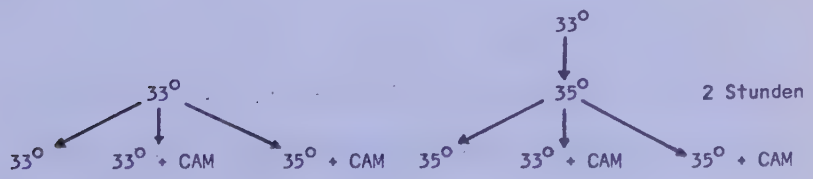
Aus diesen Daten ist zu schließen, daß beim Übergang von 35° auf 33° stimuliert initiiert wird, beim umgekehrten Übergang Initiationen verzögert werden.

3.3.3.2 Stimulierung der Initiation durch CAM nach verschiedenen Vorinkubationstemperaturen.

Um nun weiter zu analysieren, welche Rolle die Vorinkubation im Vergleich zur Temperatur während der CAM-Behandlung hat, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Zu einer Kultur, die bei 33° gewachsen war, wurde CAM (30 µg/ml) zugegeben, die Kultur geteilt, bei 33° bzw. 35° weiterinkubiert und die Rate der DNA-Synthese gemessen. Das gleiche Experiment wurde mit einer Kultur, die für 2 Stunden bei 35° vorinkubiert wurde durchgeführt. Nach Zugabe von CAM (30 µg/ml) wurde wieder bei 33° und 35° inkubiert. Vergleiche Protokoll in Tabelle 8.

Tabelle 8: Protokoll zu Experiment in Figur 22.



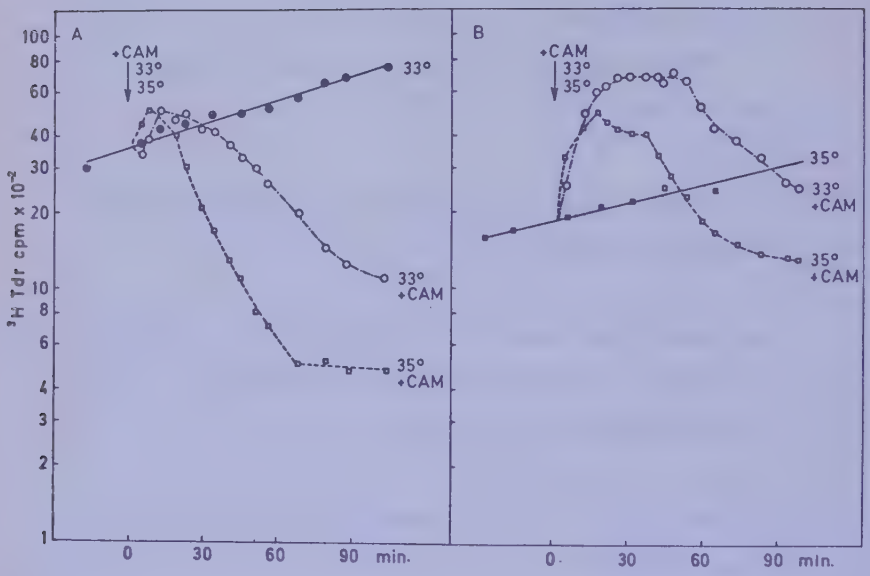


Abbildung 22: Rate der DNA-Synthese nach Zugabe von CAM (30 µg/ml)

A) Vorinkubation bei 33°, Inkubation in Gegenwart von CAM bei 33° und 35°.

B) Vorinkubation (2 Stunden) bei 35°. Inkubation in Gegenwart von CAM bei 33° und 35°.

(●—●) Kontrolle 33°, (■—■) Kontrolle 35°, (○--○) CAM 33° (□--□) CAM 35°.

Abbildung 21 A zeigt den in Tabelle 8 protokollierten Versuch mit Vorinkubation bei 33°, Abbildung 21 B den entsprechenden Versuch bei 35°. Wenn die Zellen bei 33° inkubiert wurden, ist die Stimulierung der Syntheserate durch CAM bei 33° und 35° gleich stark. Danach fällt die Rate der DNA-Synthese bei 35° steiler ab, als bei 33°. Nach Vorinkubation bei 35° steigt die DNA-Synthese mit CAM wesentlich stärker an als im entsprechenden Experiment bei 33°. Das Ausmaß der Stimulierung hängt also primär von den Vorinkubationsbedingungen ab, wobei die Stimulierbarkeit stärker ist, je höher die Temperatur vor Antibiotika-Zugabe ist. In Abb. 20 B ist die Stimulierung bei 33° noch stärker als bei 35°. Sekundär hängt die Stimulierbarkeit also auch von der Temperatur während der CAM-Behandlung ab. Hier ist die Erhöhung der Syntheserate umso stärker je tiefer die Temperatur.

Aus den Experimenten in Abb. 21 und 22 ist zu schließen, daß bei intermediärer Temperatur Initiationen verzögert sind. Sie können aus ihrem Wartezustand herausgeholt werden, sowohl durch shift auf niedrigere Temperatur als auch - das aber nur vorübergehend - durch Stop der Proteinsynthese.

3.3.3.3 Anteil stimulierbarer Chromosomen:

Bei der Stimulierung der Initiation durch CAM können entweder einige wenige Chromosomen ein paarmal initiieren oder ein großer Teil der Chromosomen ein einziges Mal. Um zwischen den beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde folgendes Dichteshift-Experiment durchgeführt.

Eine ^{14}C-Thymin markierte Kultur, exponentiell bei 33° wachsend, wurde auf 42° geshiftet, damit die Chromosomen das Ende der Replikationsrunde erreichten. Durch eine Periode von 10 min bei 33° konnten alle Chromosomen einmal initiieren. Dann wurde auf 42° geshiftet und der Anfang der Chromosomen mit ^{3}H-Thymidin markiert. Nach 5 min wurde das überschüssige Thymidin ausgewaschen. Die Zellen wurden wieder in leichtem Medium (^{12}C-Glukose; $^{14}NH_4Cl$) mit der gleichen spezifischen Aktivität ^{14}C-Thymin resuspendiert und für 2 Stunden bei 35° inkubiert, um eine erhöhte Stimulierung zu erreichen. Dann wurden die Zellen in schweres Medium (^{13}C-Glukose, $^{15}NH_4Cl$) mit der gleichen spezifischen Aktivität an ^{14}C-Thymin überführt. Ein Teil der Kultur wurde nun mit CAM, der andere ohne CAM bei 35° inkubiert. Nach weiteren 15, 30, 60 und 90 min wurden Proben genommen, lysiert und im CsCl-Dichtegradienten analysiert. Protokoll siehe Tabelle 9. Aus allen Gradienten wurde der Prozentsatz an schwerer und hybrider ^{3}H, bzw. ^{14}C-DNA bestimmt und in Fig. 23 gegen die Zeit im schweren Medium aufgetragen.

Bei der Kultur ohne CAM (Fig. 23 A) wird die ^{3}H-DNA während der ersten 30 min langsamer hybrid als bei der Kultur mit CAM. So ist nach 15 min erst 9 % im Gegensatz zu 25 % und nach 30 min erst 31 % im Gegensatz zu 41 % hybrid. Das bedeutet, daß in Gegenwart von CAM während dieser Zeit schneller initiiert wird als ohne das Antibiotikum. Nach 30 min wird die ^{3}H-DNA in der CAM-Kultur nur noch mit geringer Rate hybrid, denn nach 90 min bandet mit CAM nur 57 %, ohne CAM aber 89 % an dieser Dichte. Nach 30 min des CAM-Einflusses wird also nur noch selten initiiert, der Stop der Proteinsynthese wirkt

Tabelle 9: Protokoll zum Experiment in Abb. 23

exponentiell bei 33°
wachsende Zellen

↓

42° 50 min

↓

33° 10 min

↓

^{3}H-Puls 42° 5 min

↓

35° 120 min

↓

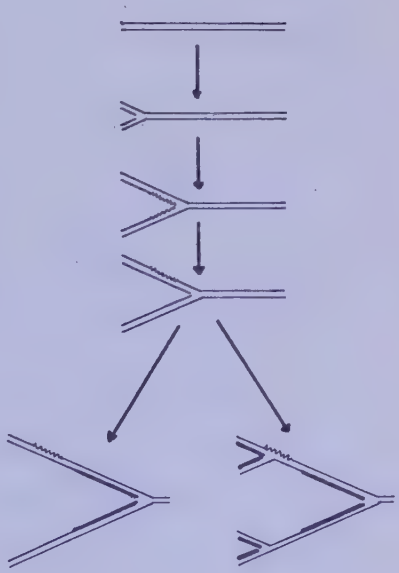
shift in (^{13}C, ^{15}N) -
Medium; t = 0

↙ ↘

35° 35° + CAM

Proben nach 15, 30,
60 und 90 min

erwartete Zustände
der Chromosomen



Situation nach 15 min im schweren Medium

—— leichte ^{14}C-DNA (^{12}C, ^{15}N)
〰 leichte ^{3}H-DNA (^{12}C, ^{15}N)
—— schwere ^{14}C-DNA (^{13}C, ^{15}N)

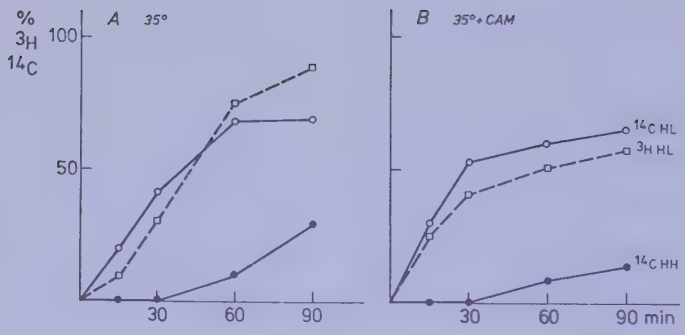


Abbildung 23: Replikation bei Stimulierung von WM 301 dnaA 5 durch CAM. Protokoll siehe Tabelle 9.

Der Prozentsatz an ^{3}H- bzw. ^{14}C-DNA hybrider (HL) und schwerer (HH) Dichte wurde anhand der Gradienten bestimmt und gegen die Zeit im schweren Medium aufgetragen.

A) - CAM

B) + CAM

hier limitierend. In der Kontrolle ohne Antibiotikum finden - wie erwartet - weiter neue Initiationen statt.

Nach ca. 45 min tritt bei der Kultur ohne CAM schweres ^{14}C-Material auf, dadurch, daß eine neue Replikationsrunde beginnt. In der Kultur mit CAM tritt schon nach 30 min das erste schwere ^{14}C auf; nach 90 min ist aber nur 14 % der ^{14}C-DNA schwer. Dieser Anteil ist damit zu erklären, daß auch einige Chromosomen, die im Moment der Zugabe des Antibiotikums einen Wachstumspunkt hatten, wieder-initiieren konnten. Da nach 90 min der Anteil an schwerer gegenüber hybrider ^{14}C-DNA klein ist (14 zu 65 %), ist auszuschließen, daß wenige Chromosomen mehrmals initiierten.

Der Vergleich des Replikationsverlaufs mit und ohne CAM erlaubt folgende Schlüsse:

1. In Gegenwart von CAM wird in der Mutante dnaA 5 initiiert. Während der ersten 30 min wird schneller initiiert als in der Kontrolle ohne Antibiotikum.

2. In Gegenwart von CAM initiieren ca. 50 % der Chromosomen einmal.

3.3.4 Initiationspotential

Unter Initiationspotential sollen hier die Initiationsproteine und die Initiations-RNA verstanden werden, die schon synthetisiert oder vorbereitet sind, aber noch nicht für eine Initiation verbraucht wurden.

Initiationsproteine und Initiations-RNA werden bei 42° in vergleichbarer Rate wie bei 30° synthetisiert; denn die Proteinsynthese ist bei 42° und 33° identisch (vergl. Fig. 1 A). Bei 30° kann fast normal initiiert werden, bei 42° ist die Initiation blockiert. Das bedeutet, daß bei 30° wenig Initiationspotential angehäuft wird, bei 42° hingegen alles, was neusynthetisiert wird.

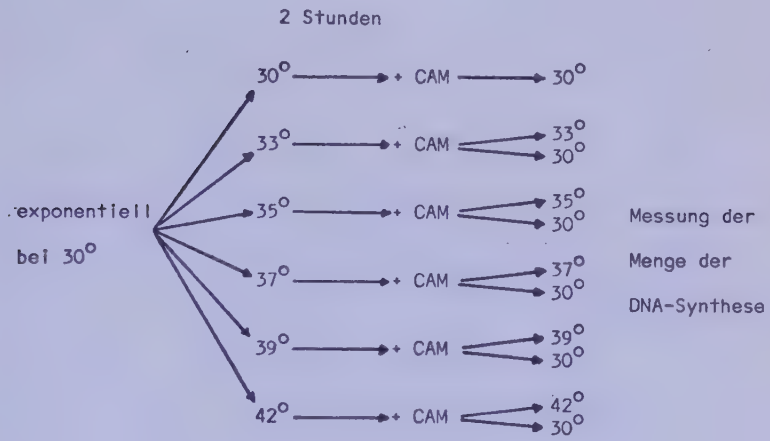
Um nachzuweisen, in welchem Maße die Initiation bei intermediären Temperaturen verzögert ist, wurde das Initiationspotential bei 30° + CAM gemessen, nachdem die Zellen für 2 Stunden bei erhöhter Temperatur inkubiert wurden. Dieses (gesamte) Initiationspotential wurde dann mit dem Anteil verglichen, der bei der Temperatur, bei der vorinkubiert wurde, verbraucht werden kann.

Eine ^{3}H-Thymin markierte, exponentiell bei 30° wachsende Kultur wurde aufgeteilt, um je einen Teil bei 30°, 33°, 35°, 39° und 42° für 2 Stunden zu inkubieren. Danach wurde CAM (30 µg/ml) zugegeben und die Menge der DNA-Synthese bei der gleichen Temperatur und bei 30° gemessen. Nach 8 Stunden haben alle Kurven ein Plateau erreicht. Die Zunahme an DNA, d. h. die Plateau-Werte, wurden in Fig. 24 in

Abhängigkeit der Temperatur der Vorinkubation aufgetragen.

Protokoll siehe Tabelle 10:

Tabelle 10: Protokoll zu Experiment in Fig. 24



Die bei 30° gemessene Restsynthese an DNA (Fig. 24) nimmt mit steigender Temperatur zu, d. h. die Gesamtmenge an verfügbaren Initiationsproteinen steigt an. In ähnlicher Weise nimmt das Initiationspotential zu, wenn die restliche DNA-Menge bei der Temperatur der Vorinkubation bestimmt wird. Bei 42° jedoch ist keine Initiation mehr möglich und vorhandene Initiationsproteine können nicht mehr zur Initiation führen.

Mit ansteigender Temperatur ist die Initiation also kontinuierlich immer stärker verzögert. Bei Temperaturen bis 39° kann angehäuftes Initiationspotential verbraucht werden.

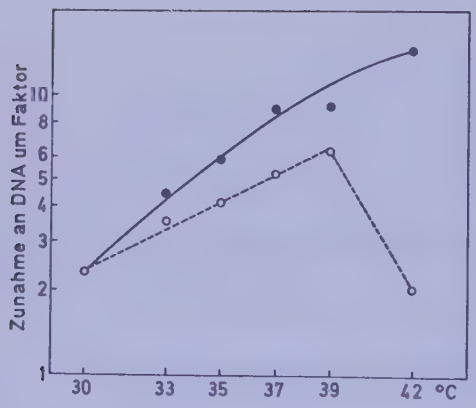


Abbildung 24: Vorbereitung und Verbrauch von Initiationsproteinen bei verschiedenen Temperaturen (WM 301 dnaA 5).

Protokoll siehe Tabelle 10.

Vor CAM-Zugabe (30 µg/ml) wurde zwei Stunden bei der angegebenen Temperatur inkubiert. (● —— ●) Messung des angehäuften Initiationspotentials bei 30°, (o--- o) Messung des angehäuften Initiationspotentials bei der Temperatur der Vorinkubation.

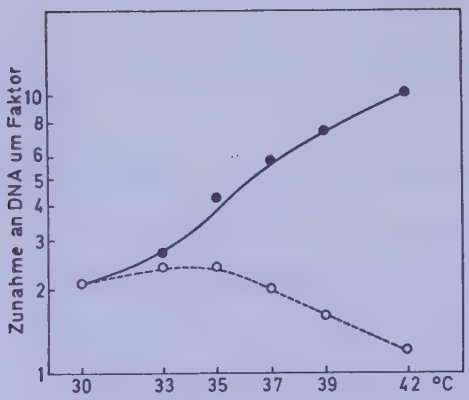


Abbildung 25: Vorbereitung und Verbrauch von Initiations-RNA bei verschiedenen Temperaturen (WM 301 dnaA 5).

Protokoll siehe Tabelle 10.

Vor Rif-Zugabe (150 µg/ml) wurde zwei Stunden bei der angegebenen Temperatur inkubiert. (●——●) Messung des angehäuften Initiationspotentials bei 30°, (o- - - o) Messung des angehäuften Initiationspotentials bei Temperatur der Vorinkubation.

Die Gesamtmenge des Initiations-RNA-Komplexes, gemessen als Restsynthese bei 30° in Gegenwart von Rif, nimmt mit ansteigender Temperatur ähnlich zu wie die Initiationsproteine (Abb. 25). Im Gegensatz dazu findet man keinen Anstieg, wenn die Restsynthese in Gegenwart von Rif bei der Temperatur der Vorinkubation gemessen wird. Der vorbereitete Initiations-RNA-Komplex kann also dann nicht verwendet werden. Dieselben Resultate wurden mit WM 301 dnaA 46 erhalten.

Die Mutanten dnaA 203, dnaA 204, dnaA 205, dnaA 211 und dnaC 201 zeigten bei keiner Temperatur eine erhöhte Restsynthese in Gegenwart von CAM. Falls bei diesen Mutanten Initiationspotential angehäuft wird, kann es also bei der betreffenden Temperatur nicht verwendet werden.

Zusammenstellung und Interpretation der Daten zur Stimulierung und Verzögerung der Initiation:

1. Die Initiation der DNA-Synthese geht mit ansteigender Temperatur von 30 - 42° kontinuierlich langsamer, d. h. sie ist mehr und mehr verzögert.
2. Die Stimulierbarkeit der Initiation durch Stop der Proteinsynthese nimmt in gleicher Weise zu.
3. Initiationen sind bei Temperaturen bis 39° möglich.
4. Die Rate, mit der angehäuftes Initiationsprotein verwertet werden kann, ist unabhängig vom dnaA-Produkt, da die Anfangssteigung der DNA-Synthese nach Stimulierung der Initiation bei verschiedenen Temperaturen (Fig. 20) sehr ähnlich ist.

Daraus wird geschlossen, daß die Möglichkeit der Stimulierung der Initiation eine Folge des erhöhten Initiationspotentials ist, also auf der Verzögerung der Initiation beruht. Ein teilweise denaturiertes dnaA-Produkt verursacht diese Verzögerung der Initiation.

3.4 Genetische Daten

3.4.1 Dominanz von dnaA

Das dnaA-Produkt ist an der Kontrolle des Initiations-RNA-Operons beteiligt. Es könnte der Repressor dieses Operons sein oder ein Effektor, der für die Dissociation des Operator-Repressor-Komplexes erforderlich ist. In einer partiell diploiden Zelle, die heterozygot $dnaA^+/dnaA^-$ ist, erwartet man im ersten Fall, daß $dnaA^-$ transdominant über $dnaA^+$ ist, analog den i^S-Mutanten (Superrepressor-Mutanten) im Laktose-Operon. Kodiert das dnaA-Gen jedoch für einen Effektor, sollte erwartet werden, daß $dnaA^+$ dominant ist. DnaA 203, dnaA 204, dnaA 205 und dnaA 211 erwiesen sich als dominant über den Wildtyp (Beyersmann et al., 1974). Demgegenüber wurde die Mutation dnaA 46 von Wechsler und Gross (1971) als rezessiv gegenüber $dnaA^+$ beschrieben. Um sicherzustellen, daß diese Diskrepanz experimentell bedingt ist, wurde auch für dnaA 5 und dnaA 46 untersucht, ob sie dominant über $dnaA^+$ sind.

Zu diesem Zweck wurden merodiploide Zellen selektioniert, die das Episom F' 133 mit den Markern *dnaA*$^+$, *met*$^+$ und *ilv*$^+$ enthalten (Beyersmann et al., 1974). Kreuzungen zwischen einem F' 133 tragenden Donor (KLF 33/JC 1553) und WM 301 *dnaA* 5 *met*, WM 301 *dnaA* 46 *met* wurden durchgeführt wie in Material und Methoden beschrieben. WM 301 *dnaA* 5 *met*$^+$ bzw. WM 301 *dnaA* 46 *met*$^+$ Merogenoten wurden bei 30° selektioniert. Von je 116 unabhängig selektionierten Merogenoten waren alle temperatursensitiv, d. h. sowohl *dnaA* 5 als auch *dnaA* 46 erwiesen sich als dominant über *dnaA*$^+$.

3.4.2 Transdominanz von *dnaA* 5

Das Gen A des Phagen P2 kodiert für ein cis-dominantes Initiationsprotein (Lindahl, Hirota, and Jacob, 1971). Es wäre also möglich, daß auch die Dominanz von *dnaA* auf einer cis-Dominanz beruht, da der Initiationspunkt des Chromosoms (origin) sehr nahe am Gen *dnaA* kartiert worden ist (Bird et al., 1972).

In 1 - 5 % der F' 133 tragenden Merogenoten sollte eine Rekombination zwischen dem Episom und dem Chromosom erwartet werden (Low, 1973), so daß nunmehr *dnaA* auf dem Episom lokalisiert ist.

Um solche *dnaA* tragenden Episomen zu erhalten wurde F' 133 von WM 301 *dnaA* 5/F' 133 auf *E. coli* AB 2279 *ilv* übertragen, indem

für Erwerb des *ilv*$^+$-Markers im Rezipienten bei 30° selektioniert wurde. 5 % dieser Merogenoten erwiesen sich als temperatursensitiv, hatten also ein F' 133 *dnaA* 5 Episom erhalten.

Um die Möglichkeit einer Rekombination zwischen Episom und neuem Wirtschromosom auszuschließen, wurde dieses F' 133 *dnaA* 5 in einer weiteren Kreuzung auf einen *recA*$^-$-Stamm (KLF 41 *met*$^+$) übertragen. Merogenoten wurden durch Wachstum auf Medium ohne Methionin bei 30° selektioniert. Alle Merogenoten, die also die genetische Konstitution KLF 41 *recA dnaA*$^+$ *met* / F' 133 *dnaA* 5 *met*$^+$ besitzen, sind temperatursensitiv (60 Kolonien wurden getestet).

Damit ist eindeutig bewiesen, daß die Mutation *dnaA* 5 transdominant ist. Dies unterstützt die Hypothese, daß das *dnaA*-Produkt das negative Kontrollelement selbst darstellt.

4 Diskussion

Die Mutation dnaA 5 blockiert die Initiation der DNA-Synthese bei nichtpermissiver Temperatur. Initiationsmutanten unterscheiden sich durch folgende Eigenschaften von Mutanten die die Elongationsreaktion der Replikation betreffen:

a) Inkubation bei nichtpermissiver Temperatur ergibt eine DNA-Restsynthese um den Faktor 1,4.

b) Die Zahl der Zellen nimmt bei 42° um den Faktor 2,6 zu.

c) Reinitiation bei permissiver Temperatur erfolgt an einer spezifischen Stelle auf dem Chromosom.

Ein Teil dieser Kriterien wurde auch für die Charakterisierung anderer dnaA-Mutanten und von dnaC-Mutanten benützt (Hirota et al, 1968; Schubach et al, 1973; Wolf, 1972; Abe and Tomizawa, 1971; Carl, 1970; Beyersmann et at. 1974).

4.1 Wirkungsort des dnaA und dnaC Produktes

Einige Initiationsmutanten produzieren ein Protein, das bei 42° inaktiv ist, sich aber bei der permissiven Temperatur zu aktiver Konformation zurückfaltet. In dieser Arbeit zeigten zwei von sechs untersuchten dnaA-Mutanten und zwei von zwei dnaC-Mutanten diese Eigenschaft. Auch für andere dnaA- und dnaC-Mutanten wurde dieses nachgewiesen (Abe und Tomizawa, 1971; Wolf, 1972; Schubach et al, 1973; Hanna and Carl, 1974).

Die Renaturierbarkeit der Mutantenproteine erlaubt den Nachweis, daß sowohl dnaA-Produkt als auch dnaC-Produkt bei 42° synthetisiert und akkumuliert wird. Aus der Tatsache, daß in manchen Experimenten (Fig. 6, 7) Initiationspotential für mehrere Initiationen angehäuft werden kann, folgt, daß alle für die Initiation erforderlichen Proteine für mehrere Initiationen in stabiler Form gestapelt werden können. Da andererseits ohne vorausgehende Akkumulation von Initiationspotential für jede neue Initiation Proteinsynthese erforderlich ist (Maaløe and Hanawalt, 1961) folgt weiter, daß während der Initiation spezifische Proteine verbraucht oder inaktiviert werden.

RNA-Synthese ist erforderlich für die Initiation. Es wird vermutet, daß die synthetisierte RNA als Primer für die DNA-Synthese dient. Alle bekannten DNA-Polymerasen brauchen einen solchen Primer, um die Polymerisationsreaktion zu starten. Kovalent an DNA gebundene RNA wurde gefunden bei Phagen (Wickner, Brutlag, Schekman, and Kornberg, 1972; Keller, 1972; Speyer, Chao, and Chao, 1972) und in einigen Eukaryonten-Systemen (Faras, Taylor, Levinson, Goodman, and Bishop, 1973; Waqar and Huberman, 1973; Barker, Kurtz, Taylor, and Ackermann, 1973). Bei E. coli gibt es indirekte Hinweise für eine solche Initiations-RNA (Lark, 1972; Messer, 1972). Initiations-RNA könnte auch eine Rolle bei der Stabilisierung der geordneten Struktur der Chromosomen spielen (Worcel and Burgi, 1972; Lark, 1972) und in dieser Eigenschaft notwendig sein für die Segregation.

Sowohl in der dnaA 5 als auch in der dnaC 201 Mutante kann bei nichtpermissiver Temperatur Initiations-RNA oder ein "Initiations-RNA-Komplex" angehäuft werden, der nachfolgende Initiation bei 30° in der Gegenwart von Rif erlaubt. Renaturierbarkeit der Mutantenproteine ist eine Voraussetzung für diese Experimente, da nur dadurch sichergestellt werden kann, daß alle für die Initiation erforderlichen Proteine in Gegenwart von Rif vorhanden sind.

Solche Initiation in Gegenwart von Rif kann entweder dadurch erklärt werden, daß Initiations-RNA bei 42° synthetisiert wurde, oder dadurch daß RNA-Polymerase einen Komplex mit dem Promotor für Initiations-RNA gebildet hat. Ein solcher Komplex ist stabil gegen Rif nach der Bildung eines Dinukleotids (Mangel and Chamberlin, 1974). Isolierung und Messung der Menge an Initiations-RNA zeigt, daß der erste Fall für dnaC-Mutanten zutrifft, der zweite für dnaA-Mutanten (Messer und Schindler-Tippe, in Vorbereitung).

Damit ist gezeigt, daß der Wirkungsort für das dnaC-Produkt nach der Synthese der Initiations-RNA liegt, d. h. am Übergang von Ribonukleotid- polymerisierender zu Desoxyribonukleotid- polymerisierender Aktivität. Das dnaA-Produkt hingegen hat seinen Wirkungsort vor der Synthese der Initiations-RNA, d. h. aktives dnaA-Produkt ist für die Initiations-RNA-Synthese erforderlich. In WM 301 dnaA 5 wird bei 42° der Rif-resistente Komplex zwischen RNA-Polymerase und DNA gebildet, in WM 301 dnaA 46 konnte er nicht nachgewiesen werden.

4.2 Negative Kontrolle der Initiation

Hemmung der Proteinsynthese durch Zugabe von CAM oder Rif oder durch Entzug von benötigten Aminosäuren führt in den Mutanten *dnaA* 5 und *dnaA* 46 zu einer kurzzeitigen Stimulierung der Initiation. Die Initiation könnte durch positiv wirkende Aktivatoren oder durch negativ wirkende Inhibitor- oder Repressor-Proteine (oder beides) kontrolliert werden. Die Hemmung der Synthese eines positiven Kontrollelements kann offensichtlich eine Stimulierung der Initiation nicht erklären. Die einzig mögliche Erklärung für die beobachtete Stimulierung ist die Annahme, daß die Synthese eines negativ wirkenden Kontrollproteins blockiert wird. Dieses müßte eine ausreichend hohe turnover-Rate haben, so daß sich die Hemmung der Synthese sofort auswirkt. Ein solches Kontrollprotein könnte ein Inhibitor der Initiation oder ein Repressor sein.

Ein negatives Kontrollelement wurde von Goebel (1973) für die Initiation der DNA-Synthese von Plasmiden und von Blau und Mordoh (1972) für die Initiation von *E. coli* postuliert. Die letzteren Autoren fanden bei *E. coli* K12 CRT 46 (dieser Stamm enthält das gleiche *dnaA* 46 Allel wie WM 301 *dnaA* 46) eine Stimulierung der Initiation nach Zugabe von niedrigen Konzentrationen (2,5 µg) CAM. Sie interpretierten dies als differentielle Empfindlichkeit der Synthese eines "Antiinitiators" gegen niedrige Konzentration CAM. Jedoch führt erst die Beobachtung, daß in WM 301 *dnaA* 5 und

WM 301 dnaA 46 die Initiation stimuliert wird durch Hemmung der gesamten Proteinsynthese zwingend zur Postulation eines negativen Kontrollelements.

Die Existenz dieses negativen Kontrollelements konnte nur in den Mutanten dnaA 5 und dnaA 46 nachgewiesen werden. Bei vier anderen dnaA Mutanten, zwei dnaC Mutanten und beim Wildtyp konnte die Initiation nicht stimuliert werden. Dies korreliert mit der Beobachtung, daß nur in den beiden Mutanten dnaA 5 und dnaA 46 bei permissiver und halbpermissiver Temperatur Initiationspotential akkumuliert wird, das bei der Temperatur, bei der es angehäuft wurde auch verbraucht werden kann. Die Anhäufung dieses Initiationspotentials beruht offenbar auf der Verzögerung der Initiation in diesen Mutanten. Dadurch daß das dnaA-Produkt teilweise denaturiert ist, kann nicht initiiert werden und es werden Initiationsproteine angehäuft über die Zeit hinaus, in der diese im Wildtyp bereits in einem neuen Initiationsereignis verbraucht sind. Dieses teilweise inaktive dnaA-Produkt steht aber im Gleichgewicht mit aktivem und kann dadurch zur Initiation führen (siehe Seite 54). Damit wird auch verständlich, weshalb die Mutanten dnaA 203, dnaA 204, dnaA 205, und dnaA 211 kein nachweisbares Initiationspotential anhäufen, denn ihr Produkt zeigt irreversible Thermodenaturierung.

Die Beobachtung, daß mit ansteigender Temperatur das Ausmaß der Stimulierung der Initiation zunimmt und mehr Initiationspotential

angehäuft wird, deutet darauf hin, daß das dnaA-Produkt direkt in diesem Regelkreis beteiligt ist. Dabei könnte das dnaA-Produkt das negative Kontrollelement selbst sein oder ein Antagonist zu diesem.

Die Beobachtung, daß die dnaA-Mutation trans-dominant ist, könnte darauf hinweisen, daß das dnaA-Produkt selbst das negative Kontrollelement darstellt. Es ist aber auch möglich, daß durch Vermischen von Mutanten- und Wildtyp-Untereinheiten ein im ganzen temperatursensitives Produkt entsteht. In diesem Fall könnte das dnaA-Produkt auch der Antagonist des negativen Kontrollproteins sein. Für beide Fälle gibt es Parallelen im Gen für den lac-Repressor. i^S-Mutanten (Suppressor) sind trans-dominant, nicht induzierbar, da ihnen die Fähigkeit Induktor zu binden verloren gegangen ist (Willson, Perrin, Cohn, Jacob, and Monod, 1964; Bourgeois and Jobe, 1970). i^{-D}-Mutanten sind trans-dominant konstitutiv, da eine Mutantenuntereinheit den/einen gesamten Tetrameren-Verband inaktivieren kann (Müller-Hill, Crapo, and Gilbert, 1968). Trans-dominante i^{-D}-Mutanten sind selten im Vergleich zu i^--Mutanten, welche rezessiv gegenüber i^+ sind. Auf der anderen Seite sind alle i^--Mutanten trans-dominant. Da alle untersuchten dnaA-Mutanten trans-dominant waren, scheint dnaA eher dem i^S-Typ zu entsprechen.

Danach wäre das dnaA-Produkt ein negatives Kontrollelement, z. B. ein Repressor. Die temperatur-sensitive Läsion müßte - ähnlich wie

die Läsion bei I^s-Mutanten - darauf beruhen, daß das denaturierte Protein als negatives Element nicht mehr ausgeschaltet werden kann; also bei 42^o nicht mehr von der DNA abzulösen ist.

Im folgenden soll ein Modell vorgestellt werden, das die beschriebenen Daten erklärt (Fig. 26). Am origin, d. h. an der Startstelle für die Replikation, gibt es ein Operon bestehend aus dem Promotor P_I, einer Operator-Region O_I und dem Strukgen für die Initiations-RNA. Nach erfolgter Transkription der I-RNA ist dnaC-Produkt erforderlich, um die I-RNA durch Desoxyribonukleotide zu verlängern. Das dnaA-Produkt ist der Repressor zu O_I. An O_I gebundener Repressor steht im Gleichgewicht mit freiem Repressor. Es ist dieses Gleichgewicht, das bei nicht-permissiver Temperatur gestört ist, indem die Konformationsänderung von gebundenem zu freiem Repressor nicht mehr erlaubt ist. Das Ablösen des Repressors könnte einen Effektor erfordern, es könnte aber auch lediglich durch die Konzentration an freiem Repressor reguliert sein. Dieses Modell gibt die Verhältnisse für eine Replikationsrichtung an und muß für bidirektionale Replikation symmetrisch verdoppelt werden.

Nach diesem Modell wäre die Konzentration an freiem Repressor eines der Schlüsselelemente für die Regulation. Die Zahl an freien Repressormolekülen pro Zelle ist gegeben durch ein Gleichgewicht zwischen Synthese- und Abbaurate. Die Syntheserate des Repressors ist u. a. abhängig von der Gen-Dosis des Repressor-Gens. Es ist also vorteilhaft für die Regulation, wenn diese Gendoses während der Dauer eines Zyklus nicht verändert wird. Vermutlich ist das der Grund dafür,

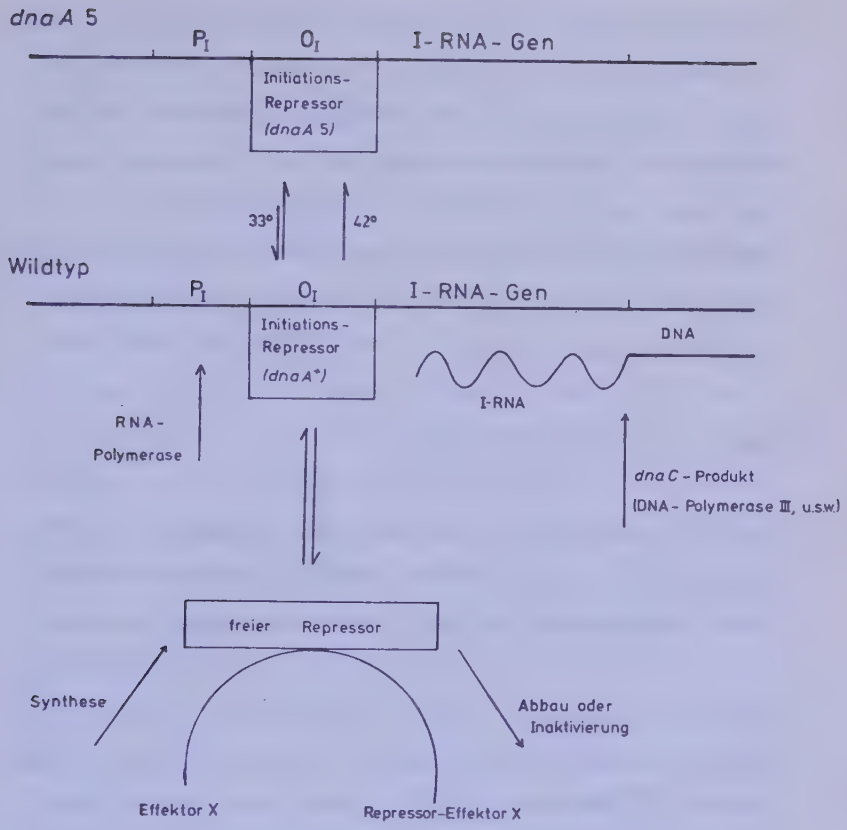


Abbildung 26: Modell zur Initiation der DNA-Synthese: Das Initiations-RNA-Operon.

P_I Promotor des Initiationsoperons

O_I Operator des Initiationsoperons

I-RNA Initiations-RNA, kovalent an neusynthetisierte DNA gebunden.
Das Modell ist symmetrisch zu verdoppeln für bidirektionale Replikation.

daß das Gen dnaA sehr nahe am origin der Replikation liegt. Initiation erfolgt immer dann, wenn die Konzentration an freiem Repressor erniedrigt wird. Die Wirkung von CAM beruht nach diesem Modell darauf, daß die Konzentration an freiem Repressor durch Blockieren seiner Synthese bei gleichzeitigem Abbau erniedrigt wird. Bei permissiver, nicht aber bei nicht-permissiver Temperatur verschiebt sich dann das Gleichgewicht von gebundenem zu freiem Repressor, so daß die I-RNA transkribiert werden kann.

4.3 Zeitliche Kontrolle der Initiation

Die Initiation der Replikation erfolgt in regelmäßigen Abständen, deren Länge durch die Rate der Proteinsynthese determiniert ist. Sobald der Gegenwert einer Generation Proteinsynthese angehäuft ist, erfolgt (im Wildtyp) Initiation. Im hier vorgestellten Modell könnte die Korrelation zwischen Proteinsynthese und Auslösung der Initiation dadurch erfolgen, daß durch Synthese und Abbau die Zahl freier Repressormoleküle konstant gehalten wird, daß aber ihre Konzentration durch Volumenzunahme der Zellen abnimmt. Die Gleichgewichts- und Bindungskonstanten könnten so gewählt werden, daß dann, wenn die Konzentration an freiem Repressor auf die Hälfte abgesunken ist - das Volumen und damit der Proteingehalt der Zellen also doppelt so groß ist -, die meisten Operatoren frei sind und Initiation erfolgt. Ein ähnliches Modell wurde von Yčas et al. (1965) für die Regulation der Zellteilung vorgeschlagen, das modifiziert wurde von Pritchard et al. (1969) für die Regulation der Initiation.

Eine andere Möglichkeit, freien Repressor zu einer spezifischen Zeit zu inaktivieren, wäre durch Reaktion mit einem Effektor (X) gegeben. Dieser könnte mit einer Rate synthetisiert werden, die durch die Gesamtrate der Proteinsynthese gegeben ist und damit ein Monitor der Proteinsynthese sein. Er müßte mit hoher Kooperativität an freien Repressor binden, um den Zeitpunkt der Initiation präzise zu determinieren.

Eine andere Möglichkeit, freien Repressor zu einer spezifischen Zeit zu inaktivieren, wäre durch Reaktion mit einem Effektor (X) gegeben. Dieser könnte mit einer Rate synthetisiert werden, die durch die Gesamtrate der Proteinsynthese gegeben ist und damit ein Monitor der Proteinsynthese sein. Er müßte mit hoher Kooperativität an freien Repressor binden, um den Zeitpunkt der Initiation präzise zu determinieren.

Die Stimulierbarkeit der Initiation durch CAM zeigt, daß die Regulation des Zeitpunktes der Initiation durch ein System erfolgen muß, das durch Hemmung der Proteinsynthese sofort umkippen kann. Diese Forderung wird durch das hier vorgestellte Modell erfüllt. Sie wird nicht erfüllt durch das von Sompayrac und Maaløe (1974) vorgestellte Autorepressor-Modell und nicht durch Modelle, bei denen ein negatives Kontrollelement einmal zu spezifischer Zeit im Zyklus synthetisiert wird (Pritchard et al., 1969; Rosenberg, et al., 1969). Modelle, bei denen der Zeitpunkt einer Initiation durch Zeitmessung zwischen

dieser und der vorhergehenden Initiation erfolgt (Helmstetter, 1974), können ebenfalls ausgeschlossen werden, da unter Renaturierungsbedingungen mindestens drei aufeinander folgende Initiationen beobachtet werden (Fig. 6).

Das hier vorgestellte Kontrollsystem bestimmt nicht ausschließlich die Häufigkeit der Initiation. Andere Schritte können für die Initiation limitierend sein. Zumindest zwei derartige Reaktionen traten in den Experimenten in Erscheinung.

Zusätzlich zur Dereprimierung des Initiations-RNA-Operons und den dazu erforderlichen Kontrollfaktoren ist die Synthese weiterer Proteine erforderlich. Ein Mangel an solchen Proteinen war der Grund dafür, daß in allen Stämmen außer WM 301 dnaA 5 und dnaA 46 keine Stimulierung der Initiation durch Hemmung der Proteinsynthese erfolgt. Unter Bedingungen, bei denen mehrere aufeinanderfolgende Initiationen stattfinden können (z. B. Renaturierung nach längerer Inkubation bei 42° in dnaA 5), folgen die einzelnen Initiationen nicht unmittelbar aufeinander; sie sind über einen längeren Zeitraum verteilt. Die einfachste Erklärung dafür ist, daß aus sterischen Gründen ein minimaler Abstand zwischen zwei Replikationspunkten gegeben sein muß.

Das hier vorgestellte Modell erlaubt eine Reihe Voraussagen. Folgende genetische Voraussagen werden zur Zeit getestet:

Es sollte Mutanten im dnaA-Cistron geben, die dem i^- oder i^{-D} im lac-Repressor-Gen entsprechen. Falls der dnaA Repressor durch einen

Effektor (X) inaktiviert wird, sollte es Mutanten im Gen für X geben, die dnaA supprimieren. Suppressoren von dnaA wurden von G. Lundquist (persönliche Mitteilung) und in unserem Labor isoliert.

5 Literatur

Abe, M. and J.-I. Tomizawa. (1971). Chromosome replication in E. coli K12 mutant affected in the process of DNA initiation. Genetics 69, 1 - 15.

Barker, S. T., H. Kurtz, B. A. Taylor, and W. W. Ackermann, (1973). A covalently linked DNA-RNA molecule from human leucemia cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 1068 - 1074.

Beyersmann, D., M. Schlicht, and H. Schuster. (1971). Temperature-sensitive initiation of DNA replication in a mutant of E. coli K12. Molec. Gen. Genetics 111, 145 - 158.

Beyersmann, D., W. Messer, and M. Schlicht. (1974). Mutants of E. coli B/r defective in DNA initiation: dnaI, a new gene for replication. J. Bacteriol. 118, 783 - 789.

Bird, R. E., J. Louarn, J. Martuscelli, and L. Caro. (1972). Origin and sequence of chromosome replication in E. coli. J. Mol. Biol. 70, 549 - 566.

Blau, S., and J. Mordoh. (1972). A new element in the control of DNA initiation in E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 69, 2895 - 2898.

Bourgeois, S., and A. Jobe. (1970). Superrepressors of the lac operon. p. 325 - 341 in J. R. Beckwith and D. Zipser (ed.): The Lactose Operon. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Carl, P. L. (1970). E. coli mutants with temperature-sensitive synthesis of DNA. Mol. Gen. Genet. 109, 107 - 122.

Clark, D. J., and B. Maaløe. (1967). DNA replication and cell division cycle in E. coli. J. Mol. Biol. 23, 99 - 112.

Demerec, M., E. A. Adelberg, A. J. Clark,and P. E. Hartman. (1966). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. Genetics 54, 61 - 76.

Faras, A. J., J. M. Taylor, W. E. Levinson, H. M. Goodman, and J. M. Bishop. (1973). RNA-directed DNA polymerase of Rous sarcoma virus: Initiation of synthesis with 70 s viral RNA as template. J. Mol. Biol. 79, 163 - 183.

Goebel, W. (1973). The influence of dnaA and dnaC mutations on the initiation of plasmid DNA replication. Biochem. Biophys. Res. Comm. 51, 1000 - 1007.

Gross, J. (1972). DNA replication in bacteria. Curr. Topics in Microbiol. and Immunology 57, 39 - 74.

Hanna, M. H. and P. L. Carl. (1974). Reinitiation of DNA synthesis by DNA initiation mutants of E. coli: The role of RNA synthesis, protein synthesis and cell division. In press.

Hayes S. and W. Szybalski. (1973). Possible RNA primer for DNA replication in coliphage lambda. Fed. Proc. 32, Zitat 1746.

Helmstetter, C. E. (1967). Rate of DNA synthesis during the division cycle of E. coli B/r. J. Mol. Biol. 24, 417 - 427.

Helmstetter, C. E. (1974). Initiation of chromosome replication in E. coli II. Analysis of the control mechanism. J. Mol. Biol. 84, 21 - 36.

Helmstetter, C. E., and S. Cooper. (1968). DNA synthesis during the division cycle of rapidly growing E. coli B/r. J. Mol. Biol. 31, 507 - 518.

Helmstetter, C. E., S. Cooper, O. Pierucci, and E. Revelas. (1968). On the bacterial life sequence. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 809 - 822.

Helmstetter, C. E., and O. Pierucci. (1968). Cell division during inhibition of DNA synthesis in E. coli. J. Bacteriol. 95, 1627 - 1633.

Hirota, Y., A. Ryter, and F. Jacob. (1968). Thermosensitive mutants of E. coli affected in the process of DNA synthesis and cellular division. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 677 - 693.

Jacob, F., S. Brenner, and F. Cuzin. (1963). On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 329 - 348.

Keller, W. (1972). RNA-primed DNA synthesis in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 69, 1560 - 1564.

Lark, K. G. (1972). Evidence for the direct involvement of RNA in the initiation of DNA replication in E. coli 15 T^-. J. Mol. Biol. 64, 47 - 60.

Lark, K. G., T. Repko, and E. J. Hoffman. (1963). The effect of amino acid deprivation on subsequent DNA replication. Biochem. Biophys. Acta, 76, 9 - 24.

Laurent, S. J. (1973). Initiation of DNA replication in a temperature-sensitive mutant of B. subtilis: Evidence for a transcriptional step. J. Bacteriol. 116, 141 - 145.

Lindahl, G., Y. Hirota, and F. Jacob. (1971). On the process of cellular division in E. coli: Replication of the bacterial chromosome under control of prophage P2. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 68, 2407 - 2411.

Low, B. (1973). Rapid mapping of conditional and auxotrophic mutations in E. coli K12. J. Bact. 113, 798 - 812.

Maaløe, O. and P. C. Hanawalt. (1961). Thymine deficiency and the normal DNA replication cycle. J. Mol. Biol. 3, 144 - 155.

Maaløe, O., and N. O. Kjeldgaard. (1966). Macromolecular Synthesis. Benjamin, New York.

Mangel, W. F., and M. J. Chamberlin. (1974). Studies of ribonucleic acid chain initiation by E. coli RNA polymerase bound to T7 DNA. J. Biol. Chem. 249, 2995 - 3001.

Marunouchi, T., and W. Messer. (1972). DNA replication and cell division in E. coli at 33° C. J. Bact. 112, 1431 - 1432.

Marunouchi, T., and W. Messer.(1973). Replication of a specific terminal chromosome segment in E. coli which is required for cell division. J. Mol. Biol. 78, 211 - 228.

Marvin, D. A. (1968). Control of DNA replication by membrane. Nature 219, 485 - 486.

Masters, M., and P. Broda. (1971). Evidence for the bidirectional replication of the E. coli chromosome. Nature (New Biol.) 232, 137 - 140.

Meselson, M., and F. W. Stahl. (1958). The replication of DNA in E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 44, 671 - 682.

Messer, W. (1972). Initiation of DNA replication in E. coli B/r: Chronology of events and transcriptional control of initiation. J. Bacteriol. 112, 7 - 12.

Müller-Hill, B., L. Crapo, and W. Gilbert. (1968). Mutants that make more lac repressor. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 59, 1259 - 1264.

Powell, E. (1956). Growth rate generation time of bacteria with special reference to continuous culture. J. Gen. Microbiol. 15, 492 - 511.

Pritchard, R. H., and K. G. Lark. (1964). Induction of replication by thymine starvation at the chromosome origin in E. coli. J. Mol. Biol. 9, 288 - 307.

Pritchard, R. H., P. T. Barth, and J. Collins. (1969). Control of DNA synthesis in bacteria. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 263 - 297.

Rosenberg, B. H., L. F. Cavalieri, and G. Ungers. (1969). The negative control mechanism for E. coli DNA replication. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 63, 1410 - 1417.

Sakai, H., S. Hashimoto, and T. Komano. (1974). Replication of DNA in E. coli C mutants temperature-sensitive in the initiation of chromosome replication. J. Bact. 119, 811 - 820.

Schubach, W. H., J. D. Whitmer, and C. I. Davern. (1973). Genetic control of DNA initiation in E. coli. J. Mol. Biol. 74, 205 - 221.

Sompayrac, L., and O. Maaløe. (1973). Autorepressor model for control of DNA replication. Nature (New Biol.) 241, 133 - 135.

Speyer, J. F., J. Chao, and L. Chao. (1972). Ribonucleotides covalently linked to DNA in T4 phage. J. Virology 10, 902 - 908.

Sueoka, N., and H. Yoshikawa. (1965). The chromosome of B. subtilis. I. Theory of marker frequency analysis. Genetics 52, 747 - 757.

Waqar, M. A., and J. A. Huberman. (1973). Evidence for the attachment of RNA to pulse-labeled DNA in the slime mold, Physarum polycephalum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 174 - 180.

Ward, C. B., and D. A. Glaser. (1969). Analysis of the chloramphenicol-sensitive and chloramphenicol-resistent steps in the initiation of DNA synthesis in E. coli B/r. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 64, 905 - 912.

Wickner, W., D. Brutlag, R. Schekman, and A. Kornberg. (1972). RNA synthesis initiates in vitro conversion of M 13 DNA to its replicative form. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 69, 965 - 969.

Willson, C., D. Perrin, M. Cohn, F. Jacob, and J. Monod. (1964). Non-inducible mutants of the regulator gene in the "lactose" system of E. coli. J. Mol. Biol. 8, 582 - 592.

Wolf, B. (1972). The characteristics and genetic map location of a temperature sensitive DNA mutant of E. coli K 12. Genetics 72, 569 - 593.

Wolf, B., A. Newman, and D. A. Glaser. (1968). On the origin and direction of replication of the E. coli K 12 chromosome. J. Mol. Biol. 32, 611 - 629.

Worcel, A., and E. Burgi (1972). On the structure of the folded chromosome of E. coli. J. Mol. Biol. 71, 127 - 147.

Yčas, M., M. Sugita, and A. Bensam. (1965). A model of cell size regulation. J. Theoret. Biol. 9, 444 - 470.

Abkürzungen

CAM	Chloramphenicol
Rif	Rifampicin
Nal	Nalidixinsäure
AS	Aminosäure
Leu	Leucin
Tdr	Thymidin
Thy	Thymin
HH DNA	schwere DNA
HL DNA	hybride DNA
LL DNA	leichte DNA
cpm	Zahl der gemessenen radioaktiven Zerfälle pro Minute (Counts per minute)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik durchgeführt. Herrn Professor Dr. T. A. Trautner danke ich für die großzügige Förderung. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Messer für sein großes Interesse und für die kritische Anleitung bei der Durchführung der Arbeit. Allen Mitgliedern der Gruppe Messer danke ich für die anregenden Diskussionen.

Lebenslauf

Am 21. Juli 1944 wurde ich als Tochter des Dr. Hans Schindler und seiner Ehefrau Dr. med. Ilda, geborene Baumann, in Zürich geboren.

Von 1951 - 1957 besuchte ich die Primarschule in Küsnacht bei Zürich. Anschließend trat ich ins Freie Gymnasium in Zürich ein und legte im Herbst 1964 die Maturität (Typus A) ab.

Nach einem einjährigen Aufenthalt in den U.S.A. immatrikulierte ich mich im Wintersemester 1965/66 an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen im Fach Biologie. Das Studium absolvierte ich in Tübingen und München.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich in Tübingen meine Diplomarbeit mit dem Thema "Isolierung und Charakterisierung eines Aminosäure-Antagonisten aus Nannizzia gypsea" unter Anleitung von Prof. Dr. H. Zähner und Dr. W. Löffler. Das Studium schloß ich im Herbst 1970 mit dem Diplom mit Hauptfach Mikrobiologie ab.

1971 begann ich mit der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin. Seit Februar 1974 bin ich mit Wolfram Tippe verheiratet.